



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Caracterización de actinomicetos rizosféricos aislados  
de cultivos orgánicos de papa nativa *Solanum  
tuberosum*, L y evaluación de su actividad antagonista  
a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga  
Parasitóloga

**AUTOR**

Astrid Carolina CHUMPITAZ BERMEJO

**ASESOR**

Mg. Jorge LEON QUISPE

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Chumpitaz, A. (2019). *Caracterización de actinomicetos rizosféricos aislados de cultivos orgánicos de papa nativa Solanum tuberosum, L y evaluación de su actividad antagonista a Phytophthora infestans (Mont) de Bary*. Tesis para optar el título profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (dato opcional):

Código Orcid del asesor o asesores (dato obligatorio): 0000-0001-5865-5374

DNI del autor: 48338215

Grupo de investigación: Recursos Naturales y Bioactivos

Institución que financia parcial o totalmente la investigación:

Programa de tesis de pregrado (RRN<sup>o</sup> 06369-R-17)-VRIP

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas

Cabana Sur, Lucanas- Ayacucho (Perú)

Coordenadas: S 14°17'10"

O 73°57'51"

Año o rango de años que la investigación abarcó:

2017



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 15:05 horas del 12 de agosto de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga de ASTRID CAROLINA CHUMPITAZ BERMEJO**.


Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 004-EPMP-2019, el titulando expuso su tesis: **“CARACTERIZACIÓN DE ACTINOMICETOS RIZOSFÉRICOS AISLADOS DE CULTIVOS ORGÁNICOS DE PAPA NATIVA *Solanum tuberosum*, L Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTAGONISTA A *Phytophthora infestans* (MONT) DE BARY”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 1.8....., calificativo: Aprobado con mención honoraria


Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** a **ASTRID CAROLINA CHUMPITAZ BERMEJO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

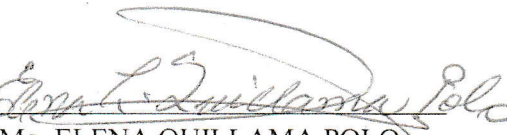
Siendo las 16:15 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 12 de agosto de 2019.

  
Dr. PEDRO CASTELLANOS SANCHEZ  
(PRESIDENTE)

  
Mg. JORGE LEON QUISPE  
(ASESOR)

  
Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA  
(MIEMBRO)

  
Mg. ELENA QUILLAMA POLO  
(MIEMBRO)

*Dedico esta tesis a mis padres Amparo y Gabriel, a mi abuelita Tomasa, a mi tía María y a César, por su apoyo constante durante mis 5 años de carrera. Los amo mucho.*

*A mis maestros por ser los que me enseñaron y motivaron a seguir estudiando microbiología.*

*Solo un verdadero científico ama lo que hace.*

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mi Alma Máter, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el financiamiento a través del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (VRIP) en el Programa de Tesis de Pregrado (RR N° 06369-R-17).
- ❖ A mi asesor Mag. Jorge León por darme la oportunidad de formar parte del Laboratorio de Ecología Microbiana, por sus conocimientos y enseñanzas, por permitirme conocer parte de su pueblo, Cabana-Ayacucho y por la confianza depositada para salir adelante.
- ❖ A Dios por haberme dado todo, una familia, amistades, personas que amo y por darme la alegría para ver el lado positivo de las cosas, siempre sacar una sonrisa a los demás.
- ❖ Al Sr. Alejandro Delgado León de la comunidad de Cabana, agricultor de papas por cultivos orgánicos, por las muestras proporcionadas y la identificación de las variedades de papas nativas.
- ❖ Al Dr. Julio Santiago y a su colaboradora Marlene Velásquez del Laboratorio de Investigación de Química Orgánica de la UNMSM por el gran apoyo brindado.
- ❖ Al Blgo Wilbert Cruz Hilacondo de la Universidad Nacional Federico Villarreal por su gran apoyo en el manejo de la cepa de *Phytophthora infestans*.
- ❖ A mis amigos tesisistas y compañeros del laboratorio de Ecología Microbiana: Sarita, Carolina, Verónica, Junior y a todos los demás. Gracias por ser mi segunda familia, gracias por todo lo compartido y por la ayuda brindada.
- ❖ A los miembros del Jurado de Tesis, por sus consejos, sus enseñanzas en mi época universitaria y en la revisión de la etapa final de este trabajo.
- ❖ Finalmente, agradecer a todo aquel que en alguna forma ha contribuido a la realización y culminación de este trabajo

## ABREVIATURAS

AAC: Agar Almidón Caseína

DMSO: Dimetilsulfóxido

kg: Kilogramo

m<sup>3</sup>: Metro cúbico

ml: Mililitro

RNA: Ácido ribonucleico

°C: Grados centígrados

A.C: Antes de Cristo

ADEX: Asociación de exportadores

Mm: Milímetro

μm: micrómetro

RFLP: Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción

Ssr: Repeticiones de secuencias simples o microsatélites

Km<sup>2</sup>: Kilómetro cuadrado

ml: Mililitro

ISP: Internacional Streptomyces Project

CAB: Cabana

m.s.n.m: Metros sobre el nivel del mar

mg: Miligramo

MINCETUR: Ministerio de Comercio Exterior y Turismo

FAO: Food and Agriculture Organization

CONAM: Consejo Nacional del Ambiente

INTA: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (ECUADOR)



## ÍNDICE

I	RESUMEN.....	1
II	INTRODUCCIÓN .....	3
III	MARCO TEÓRICO .....	5
3.1	LA PAPA ( <i>Solanum tuberosum</i> ).....	5
3.2	AGRICULTURA DE LA PAPA.....	5
3.3	CULTIVOS ORGÁNICOS.....	6
3.3.1	PAPAS NATIVAS .....	7
3.3.2	VARIEDADES DE PAPAS NATIVAS .....	7
3.4	PROBLEMAS QUE AFECTAN EL DESARROLLO DEL CULTIVO DE PAPA.....	7
3.5	EL TIZÓN TARDÍO DE LA PAPA .....	8
3.5.1.	<i>Phytophthora infestans</i> .....	11
3.5.1.1	TAXONOMÍA.....	11
3.5.1.2	MORFOLOGÍA.....	12
3.5.1.3	CICLO BIOLÓGICO.....	12
3.5.1.3.1	CICLO ASEXUAL.....	12
3.5.1.3.2	CICLO SEXUAL.....	13
3.5.1.4	VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>Phytophthora infestans</i> .....	13
3.6	ACTINOMICETOS.....	13
3.6.1	EL ORDEN ACTINOMYCETALES .....	13
3.6.2	GÉNERO <i>Streptomyces</i> .....	14
3.6.2.1	GENERALIDADES TAXONÓMICAS.....	14
3.6.2.2	MORFOLOGÍA, Y CICLO DE VIDA .....	15
3.6.2.3	ECOLOGÍA .....	15
3.7	COMPUESTOS BIOACTIVOS PRODUCIDOS POR <i>Streptomyces SP</i> .....	16
3.7.1	METABOLITOS SECUNDARIOS.....	16
3.7.2	ENZIMAS EXTRACELULARES .....	16
3.7.3	METABOLITOS CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA .....	16
IV	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	18
4.1.	Hipótesis .....	18
V	FORMULACIÓN DE OBJETIVOS, GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	18
5.1	Objetivo general: .....	18

5.2	Objetivos específicos:	18
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1	MATERIALES	19
6.1.1	Material biológico	19
6.2	MÉTODOS	19
6.2.1	LOCALIDAD DE MUESTREO	19
6.2.2	MUESTREO Y TRANSPORTE	19
6.2.3	AISLAMIENTO	20
6.2.4	SELECCIÓN DE COLONIAS DE ACTINOMICETOS	20
6.2.5	CONSERVACIÓN DE LOS CULTIVOS PUROS DE ACTINOMICETOS	20
6.2.6	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ACTINOMICETOS AISLADOS	21
6.2.7	DETERMINACIÓN HIDROLÍTICA Y ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS	21
6.2.8	CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA	22
6.2.9	CARACTERIZACIÓN DE <i>Phytophthora infestans</i>	22
6.2.10	PRUEBA DE ANTAGONISMO DE ACTINOMICETOS VS. <i>Phytophthora infestans</i>	23
6.2.11	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ORGÁNICO	23
6.2.12	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI- <i>Phytophthora</i> DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS	24
VII	RESULTADOS	25
7.1	COLONIAS DE ACTINOMICETOS	25
7.2	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS COLONIAS	25
7.3	DETERMINACIÓN HIDROLÍTICA Y ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS	29
7.4	CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS ACTINOMICETOS	34
7.4.1	Crecimiento en base a la temperatura	34
7.4.2	Crecimiento en base al pH	34
7.5	CARACTERIZACIÓN DE <i>Phytophthora infestans</i>	36
7.6	ANTAGONISMO EN MEDIOS SÓLIDOS	37
7.7	ACTIVIDAD ANTI- <i>Phytophthora</i> DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS	40
VIII	DISCUSIÓN	41
IX	CONCLUSIONES	47
X	RECOMENDACIONES	48
XI	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
XII	ANEXOS	64

## RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un cultivo agrícola muy utilizado a nivel mundial. En el Perú, la producción y consumo de este tubérculo es alto. Nuestro país cuenta con más de 600 000 agricultores de 19 departamentos de este cultivo, donde la producción disminuye a causa de la toxicidad de los fertilizantes químicos, fitopatógenos, la erosión de los suelos y otros problemas en su cultivo. En la presente investigación, se determinó la actividad antagónica de actinomicetos rizosféricos de papa nativa en el distrito de Cabana, provincia de Lucanas – Región Ayacucho, frente al Oomiceto *Phytophthora infestans*, causante de la enfermedad más hostil de la papa, conocida como Tizón Tardío. Mediante cultivos convencionales en el laboratorio se lograron aislar 32 cepas de actinomicetos utilizando agar Avena, agar Almidón Caseína, agar Czapeck y agar Asparagina. Las pruebas se realizaron en agar Avena y agar Centeno, en las que el 71,9% de las cepas de actinomicetos mostraron antagonismo a *Phytophthora infestans* en agar Avena, mientras que solo el 31,3% de actinomicetos inhibieron en agar Centeno. Se realizaron pruebas de hidrólisis de almidón e hidrólisis de celulosa, siendo el 100% de actinomicetos con capacidad amilolítica y solo el 50% celulolítica. Además, se realizaron pruebas de caracterización fisiológica a través del crecimiento a diferentes rangos de pH y temperatura, las cuales demostraron que crecen mejor a pH básicos de 7,5- 8,5 y a temperaturas de 28°C - 30°C. Se concluye que los actinomicetos rizosféricos de papa nativa producen metabolitos que inhiben el crecimiento de *Phytophthora infestans*, por lo que son microorganismos con potencial para ser usados en el control de enfermedades en la papa.

**Palabras claves:** Actinobacterias, *Phytophthora infestans*, papa nativa, biocontrol de plagas, antagonismo.

## ABSTRACT

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is a widely used agricultural crop worldwide. In Peru, the production and consumption of this tuber is high. Our country, more than 600,000 farmers from 19 departments of the country are involved who see their production performance diminishing due to the high costs of chemical fertilizers, phytosanitary problems, soil deterioration and other problems in their farming. In the present job, we tried to determine the antagonistic capacity of actinomycetes isolated from the native potato rhizosphere, collected in the district of Cabana, province of Lucanas - Ayacucho Region against the Oomycete *Phytophthora infestans* which causes the disease known as the "Late blight of potato". Using conventional cultures in the laboratory, 32 strains of actinomycetes were isolated utilizing Oat agar, Casein Starch agar, Czapeck agar and Asparagine agar. The tests were performed on Oat agar and Rye agar, in which 71,9% of the actinomycete strains showed antagonism to *Phytophthora infestans* on Avena agar, while only 31.3% of actinomycetes inhibited on Rye agar.

Starch hydrolysis and cellulose hydrolysis tests were performed, and 100% of actinomycetes showed amylolytic capacity and only 50% cellulolytic activity. Also, we carried out physiological characterization tests through their growth at different pH and temperature ranges, which showed that they grow better at basic pH of 7,5- 8,5 and temperatures of 28°C - 30°C. We conclude potato rhizospheric actinomycetes are excellent producers of bioactive compounds capable of significantly inhibiting the development of *Phytophthora infestans*, which is why they are considered as potential candidates to be used in biological control programs for pests that affect potatoes.

**Key words:** Actinobacteria, *Phytophthora infestans*, native potato, biocontrol of pests, antagonism.

## I. INTRODUCCIÓN

En Perú, la papa es el sustento de más de 711,000 familias en donde se han generado 110,000 puestos de trabajo permanentes en este rubro (Ministerio de Agricultura, 2017). La Libertad, Huánuco, Puno, Junín y Ayacucho son los departamentos con mayor producción de este tubérculo, donde todavía se practican cultivos ancestrales (MINAGRI, 2011).

El cultivo de papa presenta dificultades para su desarrollo, las enfermedades causadas por insectos y microorganismos fitopatógenos y el uso indiscriminado de agroquímicos porque disminuyen la producción y por ende ocasionan pérdidas económicas masivas (Arcos, 2017). Diversos químicos son usados de manera tradicional causando daños tanto para la papa, el agricultor y el ambiente en que se desempeñan (Ramírez *et al.*, 2014). La efectividad de un pesticida químico depende del conocimiento del patógeno, de la enfermedad y su resistencia por parte de la planta, y es necesario tener en cuenta estos puntos para un uso responsable.

Los fitopatógenos que afectan a los cultivos de papa pueden ser nemátodos, hongos, oomicetos y virus. *Solanum tuberosum* es afectado por diversos patógenos, especialmente oomicetos y hongos, los cuales destacan *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium avenaceum* y *Alternaria solani*, entre otros (García, 2016).

El tizón tardío de la papa, ocasionado por *Phytophthora infestans*, es la afección que causa los mayores efectos negativos en la papa, ya que produce la quemazón del follaje y la pudrición de los tubérculos (Monsalve-Fonnegra *et al.*, 2012).

Los controladores biológicos frente a patógenos son utilizados para evitar el uso de agroquímicos que causan daños en la planta y en el ambiente, que a *posteriori* puedan causar la resistencia de plagas (Marín *et al.*, 2013). Es por ello que se utilizan cepas

nativas de la rizósfera de las plantas con capacidad para contrarrestar el desarrollo de los patógenos. Las cepas del género *Streptomyces*, son productoras de innumerables antibióticos existentes en el mundo, es por ello su importancia frente a patógenos (Parada, 2017),

Cabe destacar que cultivo orgánico de papa nativa en el Perú es de suma importancia, ya que existen tres mil variedades de las cinco mil existentes en el mundo. Nuestro país produce más de 4,5 millones de toneladas, siendo el primer productor de América latina. Las papas nativas son 100% libres de pesticidas y transgénicos. Es por ello la importancia de estos cultivos como motivo de estudio a nivel biológico (SENASA, 2015).

En nuestro país, hay pocos trabajos de investigación que se han realizado sobre la actividad antagonista de la microbiota rizosférica frente a fitopatógenos de la papa, y es mucho menos frente al Oomiceto *Phytophthora infestans*. En el caso de la papa, tenemos la investigación de Pérez *et al.* (2015) quienes aislaron actinomicetos del compostaje frente al Oomiceto *Phytophthora infestans* y a otros patógenos; el trabajo de Rico (2009) quien aisló microorganismos como *Azotobacter sp* y actinomicetos terrestres, resaltando su capacidad antagónica; Caro (2016) quien aísla actinomicetos de rizósfera de papa y los enfrenta a diversos hongos patógenos. Medina (2014) prueba cepas de actinomicetos frente a *Phytophthora infestans*. El presente estudio contribuye con el concepto y uso de cepas nativas de actinomicetos como posibles biocontroladores del oomiceto *Phytophthora infestans* que afectan a los cultivos orgánicos de papa nativa.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **3.1 *Solanum tuberosum* L (PAPA)**

Es una planta de origen andino, dicotiledónea herbácea, perteneciente a la familia de las solanáceas, presenta tres tipos un tallo uno aéreo, en donde se encuentran las hojas y dos tipos de tallos subterráneos: rizomas y tubérculos, siendo estos de consumo alimentario (Faiguenbaum *et al.*, 1998)

El tubérculo posee yemas y una cáscara que sirve de protección, poseen variedades de forma, color, sabor y tamaño. Esto depende del tipo de papa (MINAGRI, 2006). Es comestible y nutritivo, ya que contiene 80% de agua y el 20 % posee elementos esenciales como proteínas y carbohidratos, además son utilizadas en la industria del almidón, comidas rápidas, hojuelas y puré (INTA 2004).

El crecimiento del cultivo de la papa es óptimo en condiciones de bajas temperaturas con presencia de luz solar y registra altitudes de 2 000 a 4 000 m.s.n.m, en general las temperaturas diurnas se encuentran entre 16 a 25 °C y nocturnas de 8 a 13 °C (Manrique, 2001). Los mayores rendimientos se dan en los suelos francos con un pH de 5,5 a 7,0 (Cutter, 1978).

### **3.2 AGRICULTURA DE LA PAPA**

Los cultivos andinos tienen más de 10 mil años, muchos de ellos hallados en la Sierra del Perú. Los primeros vestigios provienen del año 8,000 a.C. y fueron encontrados en la cueva Tres Ventanas, en Lima. La presencia de la papa fue notoria entre los años 4,400 y 3,100 a.C. en Ayacucho (Ministerio de agricultura, 2011).

El origen y la domesticación de *Solanum tuberosum* tuvo lugar en la sierra del Perú. Sin embargo, el cultivo intensivo de este tubérculo fue en la región ubicada cerca al Lago Titicaca, asociado al desarrollo a la cultura Tiwanaku (700-1100 a.c) (Morales, 2007)

La papa representa el 25% del PBI en el sector agrícola. Es producida por 600 mil unidades agrarias y es el principal alimento de las comunidades andinas, puesto que contiene en 100 g; almidón (18,5 g), potasio (560 mg) y en menor cantidad vitamina C (20 mg) (Cárdenas, 2009).

El Perú, posee 2,301 variedades y 91 de las 200 especies que crecen de manera silvestre en América (y que generalmente no son comestibles). Los departamentos con mayor producción de papa los departamentos de la Sierra, en especial Ayacucho, Huánuco y Cajamarca, lugares que celebran costumbres andinas y populares como el *ayni*, en donde los campesinos rinden tributo a la *Pachamama* para una buena producción (MINAGRI, 2011).

### **3.3 CULTIVOS ORGÁNICOS**

La agricultura orgánica es estilo de producción que incentiva a la población consumir alimentos libres de pesticidas y transgénicos, evitando el uso de químicos y elementos artificiales (Comisión del Codex Alimentarius, 1999). Es uno de puntos resaltados en la agricultura sostenible, donde se protege al consumidor y al ecosistema.

La agricultura orgánica difiere de la agricultura convencional principalmente porque se reglamenta en leyes y programas de certificación, se prohíbe materiales sintéticos y se fomenta la rotación de cultivos (FAO, 1999).

El SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria), se encarga de fiscalizar y promover la producción orgánica nacional. El Perú toma como referencia, las normas del Codex Alimentarius y de algunos países que consumen alimentos orgánicos, todo esto escrito en el Decreto Supremo N° 044-2006-AG (SENASA, 2015). En el País, los productos que cumplen con las normas del Decreto reciben una Certificación orgánica. Entre ellos tenemos a los tubérculos y granos andinos como quinua, maca y papa (MINCETUR, 2016).



### 3.3.1 PAPAS NATIVAS

El 16% de producción anual corresponde a la papa nativa, siendo los principales países a los que exportamos, Alemania, España y Estados Unidos con aproximadamente 500 toneladas. Las presentaciones de papa exportadas son congeladas, precocidas y fritas. Durante los últimos años, la exportación aumentó en un 211%, lo cual implica ganancias significativas, y conocimiento de la población en consumir papas nativas (MINCETUR, 2013).

### 3.3.2 VARIEDADES DE PAPAS NATIVAS

De las 3000 variedades existentes en nuestro país. Se mencionan, las papas nativas más conocidas: *Sumac Soncco*, *Qeqorani*, *Leona*, *Wencos*, *Peruanita*, *Limeña*, *Conda Huagallina*, *Huayro*, *Cacho de buey*, *Amachi*, *Azul Sunqu*, *Caspas*, *Gaspar* y *Yawar Wayku*

## 3.4 PROBLEMAS QUE AFECTAN EL DESARROLLO DEL CULTIVO DE PAPA

Los principales problemas observados en el campo son la falta de riego, mala utilización de la semilla, no hay rotación con otros cultivos, el poco control a las plagas que afecten a la papa; así como también heladas, sequías y otros efectos ambientales que dañarían al tubérculo (Caro, 2016).

Fuera del campo, el mal almacenamiento y poco cuidado en el transporte de la papa, antes de su venta, es un problema por déficit económico, ya que se contamina por patógenos oportunistas (FAO, 1996).

Cabe destacar, que el uso de agroquímicos en la papa incrementa en los países tercermundistas, estos a menudo son muy tóxicos y se manipulan con muy poca protección, sin el equipo completo, el resultado es la intoxicación por plaguicidas en las comunidades de agricultores (FAO, 2008).

### 3.5 EL TIZÓN TARDÍO DE LA PAPA

*Phytophthora infestans* puede ocasionar la destrucción total de la planta. El “tizón tardío de la papa”, produciendo grandes pérdidas económicas en Europa (Monsalve-Fonnegra *et al.*, 2012).

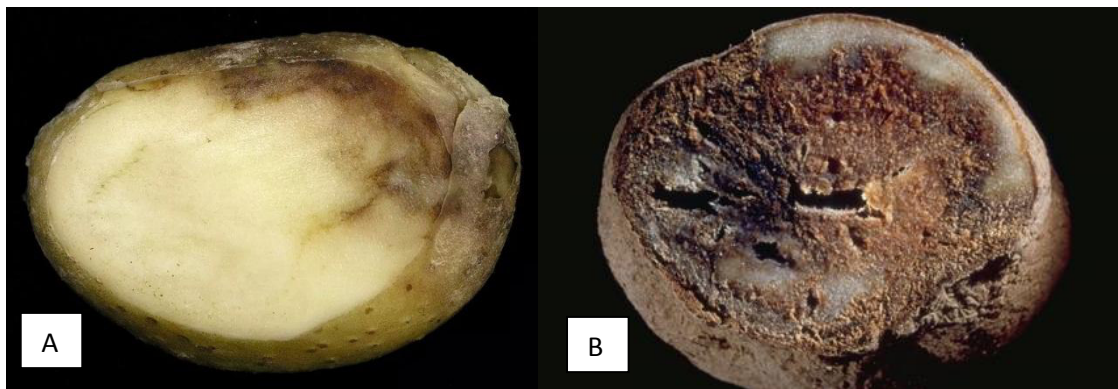
Se manifiesta principalmente en 47 especies de solanáceas como la papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*S. lycopersicum*) y pepino dulce (*S. muricatum*) (Garry *et al.*, 2005)

Los factores que influyen en el cultivo *in vitro* de *P. infestans*, son los nutrientes del medio, la temperatura y el pH. En un medio sólido suele presentar un aspecto algodonoso y blanco, y en un microcultivo, las hifas no presentan septas, mientras que los esporangios más representativos de este género pueden tener forma de limón (Fry, 2008).

*P. infestans* en condiciones de lluvia y poco cuidado en el almacenamiento, puede producir esporangios que afectarían cultivos sanos, el micelio del oomiceto se desarrollará invadirá el tejido vascular Este tipo de infección es la más devastadora, porque afecta plantas sanas en el mismo campo (Torres, 2002). Las consecuencias ocasionadas por *Phytophthora infestans* se ven en de toda la planta. La enfermedad se presenta en las hojas con manchas oscuras que formarán necrosis, en el envés se puede observar al oomiceto blanquecino. En la Figura 1 se observa un tallo que presenta lesiones oscuras en la planta. En la Figura 2, en los tubérculos se evidencian manchas en la superficie, de consistencia dura y diferente tamaño.



**Figura 1.** Tallo con presencia de lesiones oscuras a nivel superior de la planta (Infoagro, 2018)



**Figura 2.** (Cornell University, 2005)

- A. El tejido interno del tubérculo es de color marrón.
- B. Se observa necrosis en la pulpa de la papa

En el Perú el tizón tardío es la enfermedad de la papa más frecuente en la zona de Cajamarca, Contumazá y San Miguel (Ortiz *et. al* 1999). El nivel de incidencia en la Tabla 1:

**Tabla 1.** Cultivos de papa (ha) en donde afecta *P.infestans* (Egúsquiza, 2001):

Departamento	Superficie (ha)	Nivel de incidencia de rancho y área (ha) afectada			
		Muy baja	Baja	Alta	Muy alta
Cajamarca	29733	0	6735	12810	10188
Amazonas	2650	0	343	1060	1247
La Libertad	28015	225	1972	11161	14657
Áncash	29630	2669	23602	3359	0
Huánuco	30562	325	12465	12838	4934
Lima	10489	4201	4492	1346	0
Junín	37738	1188	16557	13532	6461
Ica	1822	1490	332	0	0
Huancavelica	33233	5226	14502	11412	2093
Ayacucho	8909	2165	2945	2158	1641
Apurímac	9646**	1169	7848	639	0
Arequipa	5325	650	3745	930	0
Puno	33200****	33200	4800	0	0
Moquegua	900	280	620	0	0
Tacna	1076	141	935	0	0
Totales ha	267729	52930	102333	71245	41227
%	100	19,8	38,2	26,7	15,3

(\*) INCIDENCIA DE RANCHA: Muy baja (ocasional), Baja (Requiere de 2 a 4 aplicaciones), Alta (Requiere de 6 a 8 aplicaciones), Muy alta (Requiere de 10 a más a aplicaciones) (\*\*) Considera solamente las provincias de Andahuaylas y Chincheros (\*\*\*\*) Superficie departamental redondeada

Entre 1844-1845, el tizón tardío ocasionó la pérdida masiva de cultivos de papa, afectando a Irlanda, ya que el consumo de este tubérculo es alto en ese país. En los años siguientes hasta 1848 *P. infestans* destruyó tres cosechas, lo que provocó una fuerte crisis de alimento. La catástrofe irlandesa motivó a buscar nuevas técnicas en la papa para contrarrestar la sensibilidad a fitopatógenos. En América y Europa buscaron mejorar técnicas, mediante nuevos germoplasmas para producir nuevas variedades durante el siglo XX (Ministerio de Agricultura, 2011).

### 3.5.1. Phytophthora infestans

#### 3.5.1.1 TAXONOMÍA

Según Hawksworth *et al.* (1995), *Phytophthora infestans* presenta la siguiente clasificación:

Reino: Chromista

División: Oomycota

Clase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

Familia: Pythiaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *Phytophthora infestans*

El nombre de *Phytophthora infestans*, proviene de las palabras griegas phyto = planta, phthora= destructor. Este fitopatógeno está relacionado evolutivamente con las algas pardas y diatomeas (Phaeophytas) (Pérez y Forbes, 2008).

La pared celular de los oomycetes contiene principalmente celulosa,  $\beta$ -glucanos, quitina y no sintetizan los esteroides. Estas características de los Oomycetes nos permiten diferir que evolutivamente han desarrollado de forma diferente con Ascomycetos y Basidiomycetos. (Llácer *et al.*, 1996). Aunque el parecido que tienen con los hongos cuando desarrollan *in vitro* es indiscutible.

Por la presencia de filamentos, se incluyó en primera instancia dentro del Reino Fungi (Raven *et al.*, 1999), pero hubo otras características de los oomicetos que no presentaban los hongos, es por ello que se les incluye en un reino diferente, el reino Cromista (Rossman y Palm, 2007).

### **3.5.1.2 MORFOLOGÍA**

El micelio es cenocítico, los esporangios son de diversas formas, ovoides o limoniformes con un pedicelo pequeño. Su tamaño varía de 36 x 22 µm a 29 x 19 µm.

Los esporangióforos tienen una protuberancia debajo del esporangio siguiente.

Las hormonas A1 y A2 estimulan la formación de oosporas. En *P. infestans* los aislamientos de cada tipo son autocompatibles y bisexuales, Así, aislamientos serán más “masculinos” cuando poseen más anteridios que oogonios, y más “femeninos” cuando poseen más oogonios que anteridios. También pueden poseer ambos aislamientos (Pérez y Forbes, 2008).

### **3.5.1.3 CICLO BIOLÓGICO**

El genoma de *P. infestans* fue secuenciado en 2009 en el Laboratorio Sainsbury de Norwich (Reino Unido). Posee un gran tamaño, y se debe a la cantidad de secuencias repetidas, secuencias superiores a otros oomicetos (Hass *et al.*, 2009).

*P. infestans* posee los dos tipos de reproducción: sexual y asexual. La reproducción sexual, mediante formación de oosporas, donde causa la enfermedad por la infección de células vegetales. En cambio, la reproducción asexual produce zoosporas resistentes en el suelo (Jaramillo, 2003).

#### **3.5.1.3.1 CICLO ASEXUAL**

No existe meiosis en el ciclo asexual, por lo que se generan mutaciones (Fry, 2008). Las zoosporas son liberadas de los esporangios, tienen forma de limón. Se dispersan a través del viento y del agua en condiciones óptimas (Pérez y Forbes, 2008). Luego estas estructuras desarrollan un tubo germinativo y penetran por los estomas de las plantas. Dentro de ellas, las hifas forman los esporangios que se liberarán por los estomas aproximadamente en diez días (Jaramillo, 2003).

### **3.5.1.3.2 CICLO SEXUAL**

*Phytophthora infestans* depende del apareamiento A1 y A2, de su estimulación hormonal y su autocompatibilidad entre éstos (Pérez y Forbes, 2008). Donde se forma una oospora diploide con un solo núcleo, mediante cariogamia; además forma una estructura de resistencia en condiciones de estrés (Smart *et al.*, 2000). Las oosporas forman tubos germinativos para seguir el ciclo sexual, en condiciones ambientales aceptables (Henflig, 1987).

### **3.5.1.4 VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Phytophthora infestans***

La virulencia se refiere a la habilidad genética de una raza de *P. infestans* para ser patógena. La resistencia a fungicidas se determina por la baja especificidad y sensibilidad de estos productos a *P. infestans*. Metalaxyl y otras fenilamidas son los principales fungicidas químicos que generan resistencia en este oomiceto (Pérez y Forbes, 2008). Esta resistencia es el resultado de mutaciones estables y que se heredan en las generaciones siguientes.

## **3.6 ACTINOMICETOS**

### **3.6.1 ACTINOMYCETALES**

Este orden pertenece a la Clase Actinobacteria, siendo uno de los más importantes por su utilización en la industria. Los actinomicetos forman un grupo de microorganismos morfológicamente muy heterogéneo, desde bacilos hasta filamentos ramificados, pertenecientes al dominio Bacteria, formado por bacterias generalmente aerobias, Gram-positivas, con alto contenido en G+C. Dos de las propiedades más significativas de los actinomicetos son su capacidad para desarrollarse sobre sustratos muy diversos, como la quitina, celulosa y su aptitud para sintetizar numerosos metabolitos bioactivos (Goodfellow *et al.*, 1997). La fácil segmentación de los filamentos conlleva a la

producción de bacilos y cocos. Las colonias pueden presentar filamentos, pero sin que exista un micelio verdadero. Las colonias pueden ser blancas, grises, pero también hay rojas, amarillas (Singh *et al.* 2012). Además, las cepas terrestres de actinomicetos presentan un olor característico a tierra húmeda llamada geosmina.

Los actinomicetales son anaerobios facultativos y quimioorganótrofos en su mayoría y los productos finales de la fermentación de la glucosa pueden ser ácido acético, succínico y láctico, que varían de acuerdo a la cantidad producida (Gonzales *et al.*, 2010).

### **3.6.2. GÉNERO *Streptomyces***

#### **3.6.2.1 GENERALIDADES TAXONÓMICAS**

*Streptomyces* es el género más estudiado de los Actinomycetales (Locci, 1989). Son bacterias Gram positivas y en su mayoría aeróbicas, no obstante, pueden crecer en anaerobiosis (van Keulen *et al.*, 2003).

El género *Streptomyces* es el grupo de microorganismos más estudiado entre los actinomicetos debido a su amplia gama de síntesis de metabolitos secundarios de interés en la salud, en el ambiente y en la industria comercial; sin embargo, otros géneros del Orden, tales como *Nocardia*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Actinoplanes* también han sido reportados como productores de nuevos metabolitos (Uzcátegui *et al.*, 2013). Se ha estimado que las especies de *Streptomyces* producen más del 50% de los compuestos bioactivos microbianos que se han descubierto en los últimos 50 años (Berdy, 2012).

Las colonias tienen una superficie lisa y sin esporas en los primeros días de crecimiento, mientras más días de incubación van desarrollando un micelio granulado, aterciopelado y pulverulento. Algunas colonias producen pigmentación en el micelio aéreo (Manteca y Sánchez, 2010).



Algunas especies son capaces de desarrollar un metabolismo anaeróbico facultativo basado en la respiración del nitrato (Kumon y *et al.*, 2002). *S. coelicolor* es capaz de crecer en condiciones de estrés anaeróbico (van Keulen *et al.*, 2007). El pH de crecimiento óptimo de *Streptomyces* se encuentra entre 6.5 y 8 (Crawford *et al.*, 1993), aunque se han aislado especies acidófilas y alcalófilas (Williams y Flores, 1978; Chaphalkar y Dey, 1998).

#### **3.6.2.2. MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA**

El crecimiento de *Streptomyces* ha sido estudiado en medio sólido, porque aquí son capaces de esporular, en comparación con un medio líquido (Yepes, 2010). Posee un micelio sustrato y un micelio aéreo que culminará con la formación de esporas, estas son unicelulares en esta fase (Chater y Losick, 1997).

Las esporas están formadas la fragmentación de hifas. La pared de la spora se forma por un mecanismo holotático, es decir a partir de las paredes de las hifas pre-existentes, muy frecuente en la mayoría de actinomicetos (Hasani *et al.*, 2014).

La diversidad morfológica de las esporas formadas por las hifas, poseen tipos de clasificación conocida como grupos morfológicos. Pero, aunque a veces sea posible identificar una cepa en base a criterios morfológicos evidentes y comunes, estos no son suficientes para establecer una clasificación y es indispensable considerar otras características (Lechevalier *et al.*, 1980).

#### **3.6.2.3. ECOLOGIA**

El interés ecológico de *Streptomyces* radica en su intervención en los procesos de descomposición del suelo y también en su uso potencial en biorremediación (Politi *et al.*, 2009). Frecuentemente se encuentran en suelos fértiles con concentraciones de  $10^6$  UFC/g de suelo seco (Tate, 2000).

Dentro de los actinomicetos, el género que más aislados presenta en medio sólido es *Streptomyces* (70-90%), seguido de *Nocardia* (10-30%) y finalmente *Micromonospora* (1-15%).

### **3.7 METABOLITOS DE *Streptomyces* sp.**

#### **3.7.1. METABOLITOS SECUNDARIOS**

Los metabolitos secundarios son compuestos complejos no esenciales para el crecimiento de una especie, pero cumplen funciones importantes de subsistencia dentro del ecosistema (Sutton, 1996). Muchos de estos compuestos se han aislado y caracterizado por tener como finalidad, un uso importante dentro de las industrias en salud humana, veterinaria y en la agricultura (Spandari *et al.*, 2013).

Aproximadamente 50.000 de los productos naturales son producidos por microorganismos, de los 12000 antibióticos conocidos, el género *Streptomyces* produce el 55%, otras bacterias filamentosas un 11 % y los hongos un 22% (Demain, 1999).

#### **3.7.2. ENZIMAS EXTRACELULARES**

Las actinobacterias producen una amplia gama de enzimas extracelulares (León, 2007). Ya que el genoma de *Streptomyces* codifica muchas proteínas liberadas al exterior, en condiciones favorables (Ghanem *et al.*, 2000).

Los actinomicetos producen diversas enzimas extracelulares como las lipasas, amilasas, quitinasas, celulasas (Chaudhary *et al.*, 2013). Estas son importantes en la industria del papel, textil, farmacéutica, alimentaria y del combustible. (Sharma, 2014).

#### **3.7.3. METABOLITOS CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA**

Los biactivos más conocidos con capacidad antagónica son los antibióticos. Durante los años 50 y 60 se descubrieron la gran mayoría de antibióticos, esta época se denominó como la “Edad de Oro del descubrimiento de antibióticos” (Hopwood, 2007).

Dos tercios de los antibióticos son extraídos de la naturaleza, entre los 140 géneros de actinomicetos que se conocen, se producen aproximadamente 10 000 compuestos bioactivos de uso médico, como los betalactámicos, aminoglicosidos, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos (Deepa *et al.*, 2011, Adegboye y Babalola, 2013). .

Los actinomicetos de origen marino son mejores antagonistas frente a patógenos que los actinomicetos terrestres (Vimal *et al.*, 2009).

La necesidad de nuevos agentes antimicrobianos, son uno de los desafíos que se proponen la industria farmacéutico, ya que cada vez más existen casos de infecciones oportunistas en hospederos inmunosuprimidos y cepas multidrogorresistentes, tales como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp* y *Pseudomonas aeruginosa* (Singh *et al.*, 2012).

Además, existen antibióticos con la capacidad de producir compuestos antagónicos en la agricultura frente a bacterias, hongos y oomicetos fitopatógenos, que causan grandes pérdidas económicas. Para considerar que un microorganismo sea un buen antagonista y así aplicarlo a campo, se debe tomar en cuenta que pueda expandirse sin afectar al ecosistema y que seleccione solo al patógeno, evitando la afectación a los usuarios y a los alrededores de la zona. Diversos ensayos han dado muy buenos resultados, tanto en placa como en campo, resaltando la función antagónica en cepas nativas (Quiñones *et al.*, 2016). Por ejemplo, de un actinomiceto con potencial aplicación agrícola es el caso de *Streptomyces setonii* 'UFV-RD1' aislado de tomate, capaz de inhibir la germinación de conidios de los hongos, y del Oomiceto *Phytophthora infestans*, probado tanto *in vitro* como *in vivo* (Carrer Filho, 2009).

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 4.1. Hipótesis

Los actinomicetos nativos rizosféricos de la papa (*Solanum tuberosum* L) son productores de compuestos bioactivos con capacidad antagonista frente a *Phytophthora infestans*.

- **Variables Independientes:** Actinomicetos, *Phytophthora infestans*, medios de cultivo, tipo de suelo, pH, T°, potencial redox.
- **Variables dependientes:** Producción de metabolitos secundarios, actividad antagonista de actinomicetos frente a *Phytophthora infestans*

### IV. FORMULACIÓN DE OBJETIVOS, GENERAL Y ESPECÍFICOS

#### 5.1 Objetivo general:

- Aislar, caracterizar y contar con una colección (germoplasma) de actinomicetos rizosféricos de cultivos orgánicos de papa nativa (*Solanum tuberosum* L) con actividad antagonista frente al patógeno *Phytophthora infestans*.

#### 5.2 Objetivos específicos:

- Aislar cepas de actinomicetos rizosféricos de 6 variedades de papa nativa (*Solanum tuberosum* L) cultivadas en el distrito de Cabana – Lucanas – Ayacucho - Perú.
- Evaluar la capacidad antagonista de los actinomicetos aislados frente al patógeno Oomiceto *Phytophthora infestans*.
- Caracterizar fenotípicamente mediante procedimientos macroscópicos y microscópicos de actinomicetos seleccionados con potencial aplicación como biocontrolador del “tizón tardío de la papa”.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 MATERIALES**

#### **6.1.1. Material biológico**

Los materiales biológicos que se emplearon fueron:

- a. Actinomicetos aislados de muestras de rizósfera de cultivos orgánicos de papa nativa recolectados en el distrito de Cabana – Lucanas – Ayacucho - Perú.
- b. Oomiceto fitopatógeno *Phytophthora infestans*, cepa PHU-117, mantenida en el cepario del Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) proveniente de un cultivo de papa en Huánuco.

### **6.2 MÉTODOS**

#### **6.2.1. LOCALIDAD DE MUESTREO**

El distrito de Cabana se encuentra al noreste de la provincia de Lucanas, en el Sureste de la región Ayacucho, zona de Sierra comprendida entre las coordenadas 14°17'10" Latitud Sur y 73°57'51" Longitud Oeste, a una altitud de 3,288 msnm con un área total de 402,63 Km<sup>2</sup> (León y León, 2017).

#### **6.2.2. MUESTREO Y TRANSPORTE**

La toma de muestra se realizó en los campos de cultivo de papa en el lugar denominado Huashualaca (3,740 msnm), siendo la parte más alta de la región Quechua de Cabana (León y León, 2017). Se muestreó las rizósferas (raíces y el suelo de cada variedad de papa) de 2 plantas al azar de cada uno de los campos de cultivo siendo estos pertenecientes a las variedades de papa nativa *Canchán*, *Futis*, *Huayro*, *Cuchipa-akan*, *Jompis* y *Chaska*, realizando una mezcla. Se colectó aproximadamente 200 g de muestra, las cuales se colocaron en bolsas Ziploc rotuladas y posteriormente se

trasladaron al Laboratorio de Ecología Microbiana-Ciencias Biológicas de la UNMSM para su procesamiento según Calvo *et al.* (2008).

### **6.2.3. AISLAMIENTO**

Se pesó 10 g de suelo de cada muestra (tierra rizosférica de papa), para colocarlo en 90 ml de solución salina estéril con 1,5% de fenol, se agitó aproximadamente 25 veces, para después incubarlo a 30° C por 30 minutos. Esta dilución fue considerada como  $10^{-1}$ , se traspasó 1ml a 9 ml de solución salina estéril a 0,85% y seguidamente con las demás diluciones hasta llegar a  $10^{-4}$  (Hayakawa *et al.*, 2004).

Luego, se añadió 0.1 ml de las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  por el método de diseminación, se sembraron por duplicado en Agar Avena, Agar Asparragina, Agar Czapeck y Agar Almidón Caseína, todos a pH de 7 y con nistatina a una concentración de 50 µg/mL para inhibir la a los hongos que acompañan la muestra y Ácido nalidíxico a una concentración de 25 µg/mL para eliminar a las bacterias Gram negativas. Finalmente, las placas fueron incubadas a 28° C por 15 a 20 días (León *et al.*, 2007).

### **6.2.4. SELECCIÓN DE CEPAS DE ACTINOMICETOS ANTAGÓNICOS**

Las placas que poseen colonias de actinomicetos se escogieron para aislarlas, tomando en cuenta su morfología y características típicas, por ello fueron re-sembradas en Agar Avena con nistatina y ácido nalidíxico por estriado, se incubaron en las condiciones ya mencionadas. Todos los cultivos se replican hasta conseguir su pureza (Rico, 2009).

### **6.2.5 CONSERVACIÓN DE LOS CULTIVOS PUROS DE ACTINOMICETOS**

Una vez aisladas y purificadas las cepas de actinomicetos. Se sembró los cultivos en viales pequeños con 4 ml de Agar Avena con glicerol al 20 % y se mantuvieron en una conservadora a 4°C (Sánchez *et al.*, 2011).

#### 6.2.6. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ACTINOMICETOS AISLADOS

Para caracterizar los cultivos de actinomicetos aislados se re-sembraron en agar Avena. Se describieron de acuerdo a sus características macroscópicas en placa como pigmentación, superficie, forma y consistencia. Para la caracterización microscópica, se realizó un microcultivo, utilizando azul de lactofenol para visualizar micelio aéreo y vegetativo, cadenas de esporas y fragmentación de las hifas (Franco-Correa *et al.*, 2010), para comparar en el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (Whitman *et al.*, 2012).

#### 6.2.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA Y ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Se determinó la capacidad de producir enzimas hidrolíticas como amilasas y celulasas. Para ello se utilizaron medios de cultivo como Agar Almidón y Agar Mandels y Reese, los cuales se agregó 1% de almidón y la misma cantidad de carboximetilcelulosa. Se sembró por puntura y por duplicado a los actinomicetos. Posteriormente se incubaron a 28°C por 7 días. Para revelar la actividad amilásica se agregó lugol a las placas para visualizar los halos. Y para la actividad celulolítica se añadió rojo de Congo para revelar los halos de acción celulolítica (Caicedo, 2012).

La actividad enzimática se halla con la siguiente fórmula (Hankin *et al.*, 1975).

$$\% \text{ de Actividad} = \frac{R-r}{R} \times 100$$

Dónde:

R: Radio del halo de actividad enzimática del actinomiceto

r: Radio de la colonia del actinomiceto

Para las pruebas de utilización de carbohidratos, se utilizó glucosa, manitol y sacarosa (Rico, 2009) en base al agar ISP 9 como medio mínimo.

#### 6.2.8. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

Todos los actinomicetos aislados fueron caracterizados en función de pruebas fisiológicas según Calvo y Zúñiga (2010).

**Crecimiento en base a la temperatura:** En placas de Agar Avena se sembró por puntura y por duplicado, cultivos de 5 días de actinomicetos previamente enriquecidos en el medio Extracto de Levadura Glucosa, luego fueron incubados a las temperaturas de 4 y 45°C, usando el control de 28°C. Se midieron los diámetros de las colonias por cada 2 días durante 15 días, con la finalidad de observar el crecimiento y adaptación de cada cepa de actinomicetos a las diversas temperaturas que están expuestas los cultivos de papa en el Perú.

**Crecimiento en base al pH:** En placas de Agar Avena a diferentes pH (5,5, 7 y 8,5), utilizando como control el medio de pH 7, se sembraron por duplicado, cultivos de 5 días de actinomicetos previamente enriquecidos en el medio Extracto de Levadura Glucosa. El crecimiento se determinó midiendo el diámetro de las colonias por cada 2 días durante 8 días, con el fin de determinar su adaptación a suelos de diferente pH como las que presenta la localidad estudiada, Cabana-Ayacucho.

#### 6.2.9. CARACTERIZACIÓN DE *Phytophthora infestans*

El Oomiceto fitopatógeno de mayor importancia en la agricultura de la papa por los efectos devastadores que produce es *Phytophthora infestans*. Este oomiceto fue resembrado en Agar centeno para su reactivación, mantenimiento y observación en microcultivo con azul de lactofenol (Sánchez *et al.*, 2011).

La cepa PHU 117, proveniente de cultivo de papa de Huánuco, se incubó en Agar Avena y en Agar Centeno a 28°C por 7 días, y se mantuvo a temperatura ambiente para su caracterización microscópica.



#### 6.2.10. PRUEBA ANTAGÓNICA DE ACTINOMICETOS VS. *Phytophthora infestans*

Para el ensayo de antagonismo en placa, se usó la técnica del co-cultivo, las cepas de actinomicetos fueron sembradas por puntura en 3 extremos de una placa Petri con Agar Avena y Agar Centeno, posteriormente en el centro de la placa se sembró por puntura *P. infestans* y se incubó a 28°C por 10 días (Castillo, 2004). También, se sembró *P. infestans*, por puntura en el centro de una placa de Agar Avena y Centeno libre de actinomicetos, las cuales se usaron como control, también fueron incubadas a 28°C por 10 días. Las pruebas se realizaron por triplicado. Finalmente, al cabo de este tiempo, se calculó el porcentaje de inhibición, expresado en porcentaje, siguiendo la fórmula de Ahmed *et al.* (2007) como se describe a continuación.

$$\% \text{ de Actividad} = \frac{R-r}{R} \times 100$$

Dónde:

R: Radio del halo de inhibición entre el actinomiceto y el oomiceto

r: Radio de la colonia del actinomiceto

#### 6.2.11. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ORGÁNICO

Se utilizó el procedimiento propuesto por Pérez *et al.* (2015). En 25 ml de Caldo Extracto de Levadura Glucosa se sembraron los actinomicetos con capacidad antagónica. Luego se traspasó los 25 ml en un matraz de 500 ml con 225 ml del mismo medio. Este matraz se incubó por 10 días en agitación de un shaker a 250 rpm en temperatura ambiente. Luego, el cultivo se centrifugó a 4000 rpm por 25 minutos, donde al caldo sobrenadante se le agregaron diversos solventes en una proporción de 1:1 con la finalidad de extraer y concentrar los metabolitos de las cepas antagónicas. Los solventes utilizados fueron etil acetato, diclorometano, y butanol, agitando por 1 h para completar la extracción. Después que los extractos orgánicos fueron separados del sobrenadante, estos fueron llevados al rotavapor a 40 °C para su evaporación; finalmente la concentración máxima de metabolitos fue obtenido, pesado y re-suspendido en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% para la prueba anti-*Phytophthora infestans*

#### **6.2.12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI- *Phytophthora* DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS**

Se colocó en pocillos de 5 mm, al extracto orgánico re-suspendido en dimetilsulfóxido al 10%, sobre el medio Agar Avena, donde fue previamente sembrado el oomiceto *Phytophthora infestans*. Las placas fueron incubadas por 5 días a 28°C. La actividad anti *Phytophthora infestans* se determinó por la medida del halo de inhibición según Pandey *et al.* (2004).

## VI. RESULTADOS

### 7.1. COLONIAS DE ACTINOMICETOS

Se logró aislar un total de 32 cepas de actinomicetos a partir de agar Avena, agar Asparragina, agar Almidón Caseína y agar Czapeck. Las colonias de actinomicetos: presentaron consistencia seca, fuertemente adheridas al agar y, algunas con pigmentación en el micelio (Figura 3).



**Figura 3.** Cultivos puros de ocho cepas de actinomicetos aislados en Agar Avena

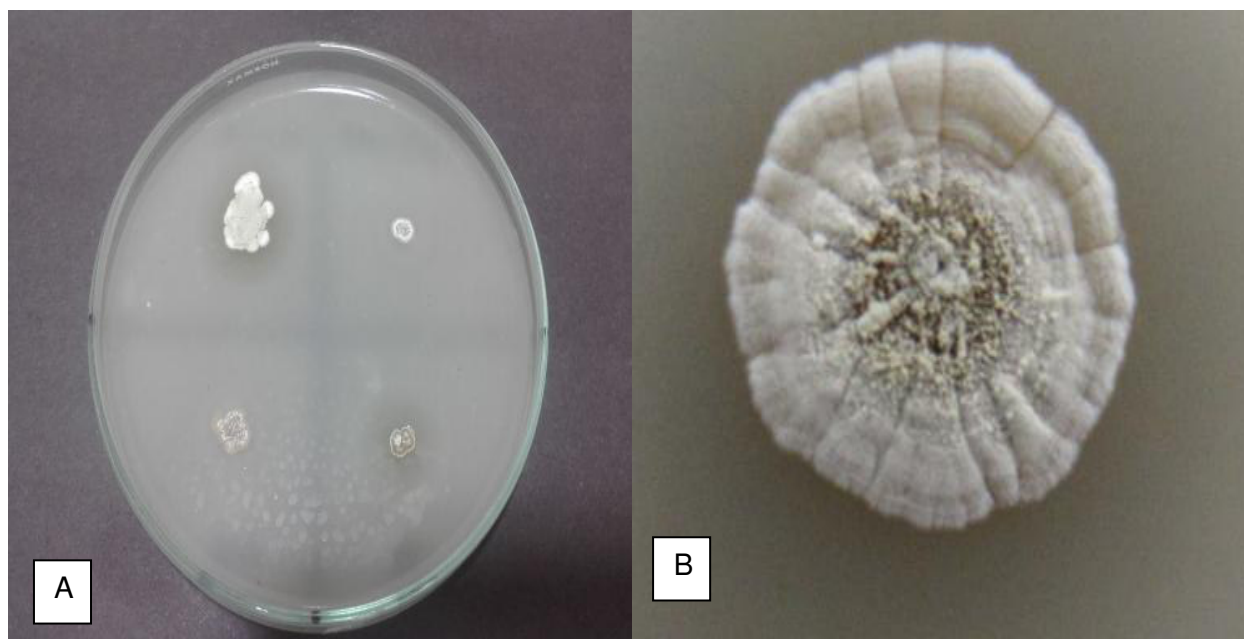
### 7.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS COLONIAS

#### Caracterización morfológica

Se observó la morfología de los actinomicetos con las observaciones macroscópicas y microscópicas de las colonias.

Dentro de las características macroscópicas, se observa que en la Tabla 2, las cepas presentan una coloración crema en su mayoría, tienen elevación convexa y pigmentación verde (Figura 4).

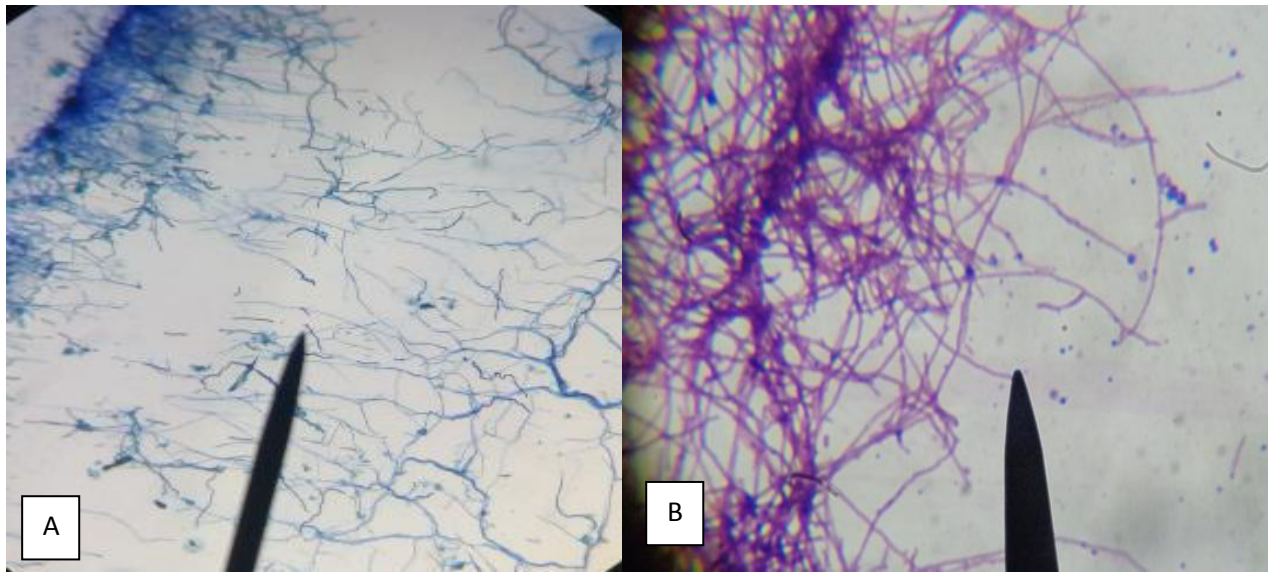
En los microcultivos, se apreciaron, fragmentación del micelio, esporas en cadena formando espirales muy parecidas a las presentadas por *Streptomyces sp* (Figura 5).



**Figura 4**

A. Colonias de actinomicetos en Agar Avena a los 5 días de cultivo

B. Colonia de la cepa CAB10\_2



**Figura 5**

- A. Microcultivo de la cepa CAB10\_2 con hifas espiraladas. Aumento: 400x (puntero)
- B. Observación microscópica de los actinomicetos. Aumento (1000x).

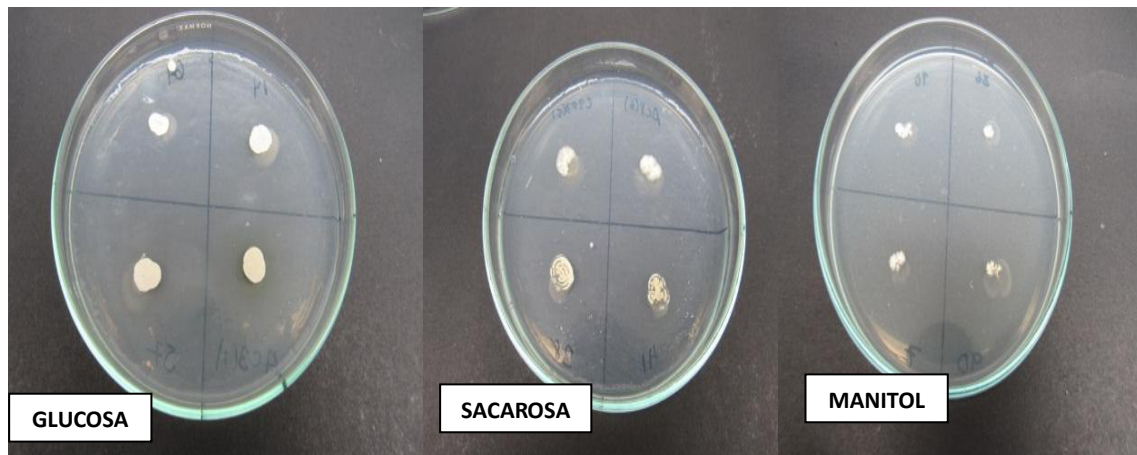
**Tabla 2.** Caracterización macroscópica de colonias de actinomicetos aisladas de la rizósfera de papa nativa, cultivadas en Cabana-Ayacucho, 2017

N° DE CEPA	CÓDIGO DE CEPA	VARIEDAD DE PAPA	CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA EN AGAR AVENA				
			FORMA	PIGMENTO	COLOR	BORDE	ELEVACIÓN
1	CAB3_1	Canchán	Regular	Verde	Blanco	Elevado	Convexa
2	CAB3_2	Canchán	Regular	Sp	Blanco	Entero	Convexa
3	CAB3_3	Canchán	Regular	Sp	Plomo	Entero	Convexa
4	CAB4_1	Canchán	Irregular	Sp	Crema	Entero	Convexa
5	CAB4_2	Canchán	Irregular	Sp	Crema	Entero	Convexa
6	CAB4_3	Canchán	Regular	Sp	Crema	Entero	Convexa
7	CAB4_4	Canchán	Irregular	Verde	Blanco	Entero	Convexa
8	CAB4_5	Canchán	Irregular	Verde	Crema	Elevado	Convexa
9	CAB4_6	Canchán	Irregular	Verde	Crema	Entero	Convexa
10	CAB5_1	Futis	Regular	Rojo	Blanco	Elevado	Convexa
11	CAB5_2	Futis	Regular	Verde	Crema	Elevado	Convexa
12	CAB5_3	Futis	Regular	Verde	Crema	Entero	Convexa
13	CAB5_4	Futis	Irregular	Verde	Crema	Entero	Convexa
14	CAB5_5	Futis	Irregular	Verde	Blanco	Entero	Convexa
15	CAB6_1	Futis	Regular	Sp	Plomo	Entero	Convexa
16	CAB7_1	Huayro	Irregular	Amarillo	Blanco	Entero	Convexa
17	CAB7_2	Huayro	Regular	Mostaza	Crema	Elevado	Convexa
18	CAB7_3	Huayro	Regular	Mostaza	Crema	Elevado	Convexa
19	CAB7_4	Huayro	Regular	Sp	Plomo	Elevado	Pulviniforme
20	CAB7_5	Huayro	Regular	Sp	Rojo	Elevado	Pulviniforme
21	CAB8_1	Huayro	Regular	Sp	Crema	Entero	Convexa
22	CAB8_2	Huayro	Regular	Verde	Crema	Entero	Convexa
23	CAB9_1	Cuchipa-akan	Regular	Sp	Blanco	Elevado	Acuminada
24	CAB9_2	Cuchipa-akan	Irregular	Sp	Crema	Entero	Convexa
25	CAB9_3	Cuchipa-akan	Irregular	Sp	Crema	Elevado	Convexa
26	CAB9_4	Cuchipa-akan	Regular	Verde	Crema	Elevado	Convexa
27	CAB10_1	Jompis	Regular	Rojo	Blanco	Elevado	Convexa
28	CAB10_2	Jompis	Irregular	Amarillo	Crema	Entero	Pulviniforme
29	CAB10_3	Jompis	Irregular	Amarillo	Plomo	Entero	Pulviniforme
30	CAB10_4	Jompis	Regular	Mostaza	Blanco	Entero	Convexa
31	CAB10_5	Jompis	Regular	Rojiza	Crema	Elevado	Convexa
32	CAB10_6	Jompis	Regular	Sp	Crema	Elevado	Convexa

Sp: Sin pigmentación

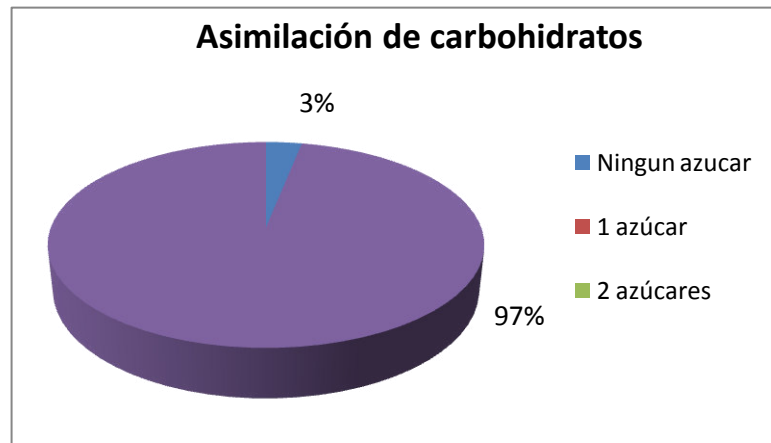
### 7.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA Y ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS

La prueba de asimilación y utilización de carbohidratos se detectó gracias al crecimiento de los actinomicetos en agar ISP 9 (medio mínimo) suplementado con glucosa, sacarosa y manitol, como se observa en la Figura 6. Todos los actinomicetos crecieron, menos uno, CAB7\_5.



**FIGURA 6.** Crecimiento de los actinomicetos en el medio ISP 9 con glucosa, sacarosa y manitol respectivamente.

Los resultados de asimilación de carbohidratos por los actinomicetos fueron muy parecidos (Tabla 3). Por la cantidad de carbohidratos utilizados (Figura 7), el actinomiceto CAB7\_5 fue el único que no utilizó ninguno de los carbohidratos (3%), mientras que 31 actinomicetos utilizaron todos los azúcares (97%). Por el tipo de azúcar utilizado, los actinomicetos utilizaron todos los azúcares (97%). Por el tipo de azúcar utilizado, los actinomicetos que usaron la glucosa fueron 31 cepas (97%), los que utilizaron la sacarosa fueron 31 (97%), y los que utilizaron el manitol también fueron 31 (97%). Presentando las colonias más grandes los que asimilaron glucosa y sacarosa, en comparación con las colonias que asimilaron manitol.



**Figura 7.**

Utilización de carbohidratos de los actinomicetos expresados en porcentajes

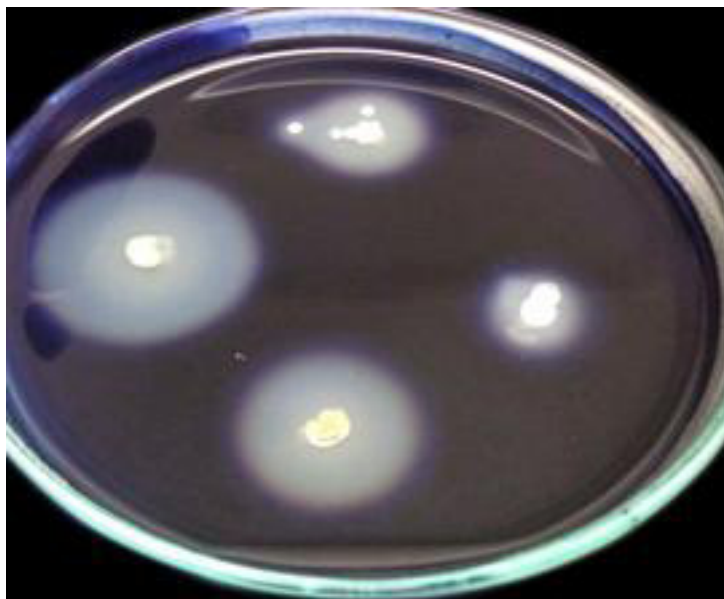


**Tabla 3.** Prueba de asimilación de carbohidratos

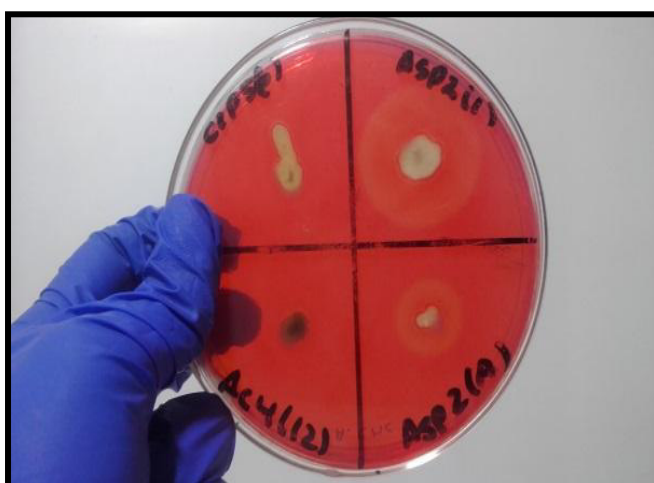
N° DE CEPA	CÓDIGO DE CEPA	VARIEDAD DE PAPA	GLUCOSA	SACAROSA	MANITOL
1	CAB3_1	Canchán	+	+	+
2	CAB3_2	Canchán	+	+	+
3	CAB3_3	Canchán	+	+	+
4	CAB4_1	Canchán	+	+	+
5	CAB4_2	Canchán	+	+	+
6	CAB4_3	Canchán	+	+	+
7	CAB4_4	Canchán	+	+	+
8	CAB4_5	Canchán	+	+	+
9	CAB4_6	Canchán	+	+	+
10	CAB5_1	Futis	+	+	+
11	CAB5_2	Futis	+	+	+
12	CAB5_3	Futis	+	+	+
13	CAB5_4	Futis	+	+	+
14	CAB5_5	Futis	+	+	+
15	CAB6_1	Futis	+	+	+
16	CAB7_1	Huayro	+	+	+
17	CAB7_2	Huayro	+	+	+
18	CAB7_3	Huayro	+	+	+
19	CAB7_4	Huayro	+	+	+
20	CAB7_5	Huayro	-	-	-
21	CAB8_1	Huayro	+	+	+
22	CAB8_2	Huayro	+	+	+
23	CAB9_1	Cuchipa-akan	+	+	+
24	CAB9_2	Cuchipa-akan	+	+	+
25	CAB9_3	Cuchipa-akan	+	+	+
26	CAB9_4	Cuchipa-akan	+	+	+
27	CAB10_1	Jompis	+	+	+
28	CAB10_2	Jompis	+	+	+
29	CAB10_3	Jompis	+	+	+
30	CAB10_4	Jompis	+	+	+
31	CAB10_5	Jompis	+	+	+
32	CAB10_6	Jompis	+	+	+

Resultados: Positivo (+), Negativo (-).

La capacidad de los actinomicetos aislados para sintetizar enzimas hidrolíticas como almidón y celulosa se presentan en la Tabla 4. Se observa que la totalidad de las cepas (100%) sintetizan amilasas, siendo la cepa CAB9\_4 la que tiene mayor actividad amilolítica (Figura 8); mientras que el 50% producen enzimas celulasas, siendo la cepa CAB10\_2 con mayor actividad celulolítica (Figura 9);



**Figura 8.** Capacidad amilásica de los actinomicetos



**Figura 9.** Capacidad celulolítica de los actinomicetos

**Tabla 4:** Producción de enzimas extracelulares de actinomicetos rizosféricos de diversas papas nativas frente a celulosa y almidón

N°	N° DE CEPA	CÓDIGO DE CEPA	Porcentaje de actividad enzimática extracelular (% $\pm\sigma$ )	
			CELULOSA	ALMIDÓN
1	CAB3_1	Canchán	-	82,25 $\pm$ 0,1
2	CAB3_2	Canchán	-	79,73 $\pm$ 0,1
3	CAB3_3	Canchán	58,14 $\pm$ 0,1	72,97 $\pm$ 0,1
4	CAB4_1	Canchán	57,40 $\pm$ 0,1	80,55 $\pm$ 0,2
5	CAB4_2	Canchán	71,10 $\pm$ 0,2	76 $\pm$ 0,1
6	CAB4_3	Canchán	71,57 $\pm$ 0,1	81,03 $\pm$ 0,1
7	CAB4_4	Canchán	-	83,03 $\pm$ 0,1
8	CAB4_5	Canchán	-	79,79 $\pm$ 0,2
9	CAB4_6	Canchán	-	28,89 $\pm$ 0,2
10	CAB5_1	Futis	55,10 $\pm$ 0,1	80,56 $\pm$ 0,3
11	CAB5_2	Futis	-	70,49 $\pm$ 0,1
12	CAB5_3	Futis	-	73,75 $\pm$ 0,1
13	CAB5_4	Futis	-	58,74 $\pm$ 0,1
14	CAB5_5	Futis	-	61,14 $\pm$ 0,1
15	CAB6_1	Futis	61,05 $\pm$ 0,1	76,09 $\pm$ 0,2
16	CAB7_1	Huayro	-	73,18 $\pm$ 0,2
17	CAB7_2	Huayro	58,33 $\pm$ 0,2	7,14 $\pm$ 0,1
18	CAB7_3	Huayro	30,50 $\pm$ 0,1	70,69 $\pm$ 0,3
19	CAB7_4	Huayro	51,20 $\pm$ 0,1	51,20 $\pm$ 0,2
20	CAB7_5	Huayro	37,50 $\pm$ 0,3	37,50 $\pm$ 0,1
21	CAB8_1	Huayro	64,39 $\pm$ 0,1	70,81 $\pm$ 0,1
22	CAB8_2	Huayro	-	74,88 $\pm$ 0,1
23	CAB9_1	Cuchipa-akan	25,00 $\pm$ 0,2	64,44 $\pm$ 0,1
24	CAB9_2	Cuchipa-akan	-	12,16 $\pm$ 0,2
25	CAB9_3	Cuchipa-akan	-	33,33 $\pm$ 0,2
26	CAB9_4	Cuchipa-akan	-	83,80 $\pm$ 0,1
27	CAB10_1	Jompis	-	61,93 $\pm$ 0,1
28	CAB10_2	Jompis	-	78,31 $\pm$ 0,1
29	CAB10_3	Jompis	63,68 $\pm$ 0,3	62,10 $\pm$ 0,2
30	CAB10_4	Jompis	75,71 $\pm$ 0,2	64,38 $\pm$ 0,1
31	CAB10_5	Jompis	73,12 $\pm$ 0,1	63,71 $\pm$ 0,1
32	CAB10_6	Jompis	54,52 $\pm$ 0,2	42,86 $\pm$ 0,2

$\sigma$ : Desviación estándar

## **7.4. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS AISLADOS DE ACTINOMICETOS**

### **7.4.1. Crecimiento en base a la temperatura**

Finalizado los 15 días, se observaron que algunas colonias crecieron en las distintas temperaturas de incubación, mientras otras, no crecieron. Tal como se observa en la Tabla 5. Así, se llegó a determinar que a 4 °C, 28 cepas (87,5%) no llegaron a crecer; a temperatura de 28°C, los 32 aislados (100%) lograron crecer; y mientras que a 45°C, solo 3 cepas (9,4%) crecieron.

### **7.4.2. Crecimiento en base al pH**

Se sembró en agar Avena a pH 5.5, pH 7,0 y pH 8.5. Transcurrido el tiempo de crecimiento, se observaron las placas de agar avena (Tabla 5). En este ensayo, se llegó a determinar que todas las cepas (100%) crecieron en los pH ya mencionados.

**Tabla 5.** Caracterización fisiológica de los actinomicetos en agar avena

NRO DE CEPA	CÓDIGO DE CEPA	VARIEDAD DE PAPA	pH			T°		
			5.5	7.0	8.5	4°C	28°C	45°C
1	CAB3_1	Canchán	++	++	++	-	++	-
2	CAB3_2	Canchán	++	++	++	-	++	-
3	CAB3_3	Canchán	++	++	++	-	++	++
4	CAB4_1	Canchán	++	++	++	-	++	-
5	CAB4_2	Canchán	++	++	++	-	++	-
6	CAB4_3	Canchán	++	++	++	-	++	-
7	CAB4_4	Canchán	++	++	++	-	++	-
8	CAB4_5	Canchán	++	++	++	-	++	-
9	CAB4_6	Canchán	++	++	++	-	++	-
10	CAB5_1	Futis	++	++	++	-	++	-
11	CAB5_2	Futis	++	++	++	-	++	-
12	CAB5_3	Futis	++	++	++	-	++	-
13	CAB5_4	Futis	++	++	++	-	++	-
14	CAB5_5	Futis	++	++	++	-	++	-
15	CAB6_1	Futis	++	++	++	-	++	-
16	CAB7_1	Huayro	++	++	++	-	++	-
17	CAB7_2	Huayro	++	++	++	-	++	-
18	CAB7_3	Huayro	++	++	++	-	++	-
19	CAB7_4	Huayro	++	++	++	+	++	-
20	CAB7_5	Huayro	++	++	++	-	++	+
21	CAB8_1	Huayro	++	++	++	-	++	-
22	CAB8_2	Huayro	++	++	++	-	++	-
23	CAB9_1	Cuchipa-akan	++	++	++	-	++	-
24	CAB9_2	Cuchipa-akan	++	++	++	-	++	-
25	CAB9_3	Cuchipa-akan	++	++	++	-	++	-
26	CAB9_4	Cuchipa-akan	++	++	++	-	++	-
27	CAB10_1	Jompis	++	++	++	+	++	-
28	CAB10_2	Jompis	++	++	++	++	++	-
29	CAB10_3	Jompis	++	++	++	-	++	++
30	CAB10_4	Jompis	++	++	++	-	++	-
31	CAB10_5	Jompis	++	++	++	-	++	-
32	CAB10_6	Jompis	++	++	++	+	++	-

(++) Crecimiento regular

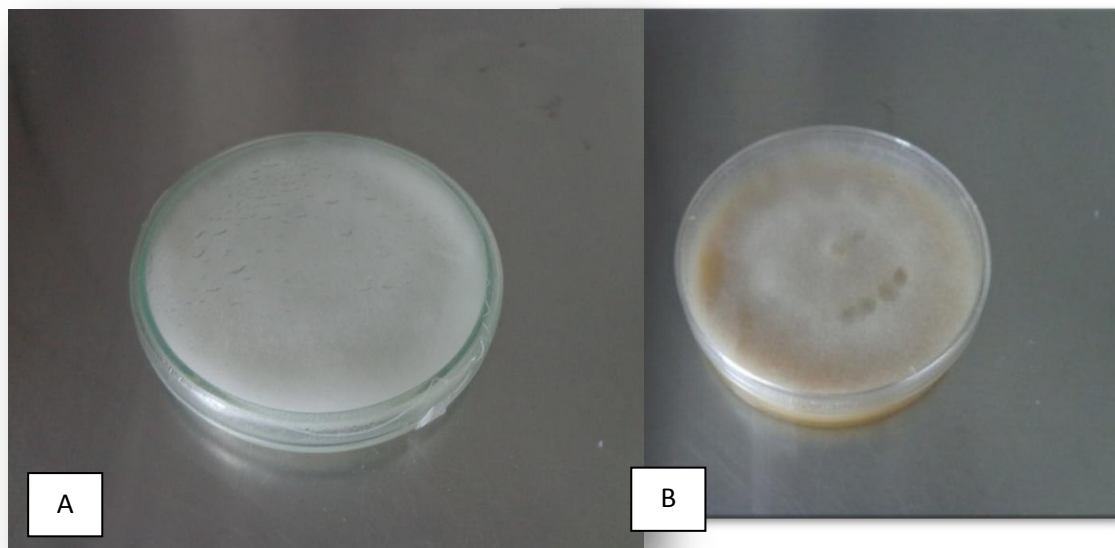
(+) Poco crecimiento

(-) No hubo crecimiento

### CARACTERIZACIÓN DE *Phytophthora infestans*

*P. infestans* en placa se presenta con un micelio aéreo blanco, algodonoso y radiado, fácil de retirar con el asa de siembra, crece en toda la placa aproximadamente en 7 días de incubación a 28°C en Agar Avena y Agar Centeno.

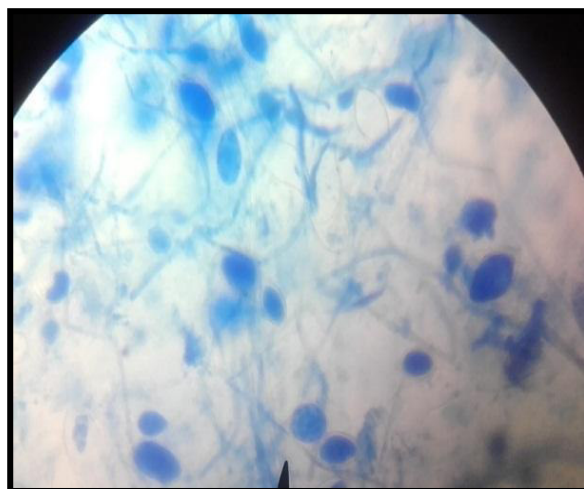
En el microscopio óptico se observan las hifas cenocíticas transparentes. Los esporangios tienen forma de limón (Fry, 2008).



**Figura 10**

A. *Phytophthora infestans* en agar Avena

B. *Phytophthora infestans* en agar Centeno



**Figura 11.** Observación microscópica de los esporangios de *Phytophthora infestans* en forma de limón y del micelio en azul de lactofenol (400x)

## 7.6. ANTAGONISMO EN MEDIOS SÓLIDOS

Al finalizar los 10 días de incubación, se calcularon los porcentajes de inhibición, midiendo la distancia del crecimiento entre el actinomiceto-*P.infestans* menos el radio de la colonia del actinomiceto, para dividirlo con la distancia del crecimiento entre el actinomiceto-*P.infestans* y multiplicarlos por 100, con expresión en porcentaje. Los resultados de las pruebas de antagonismo se encuentran en la Tabla 6.

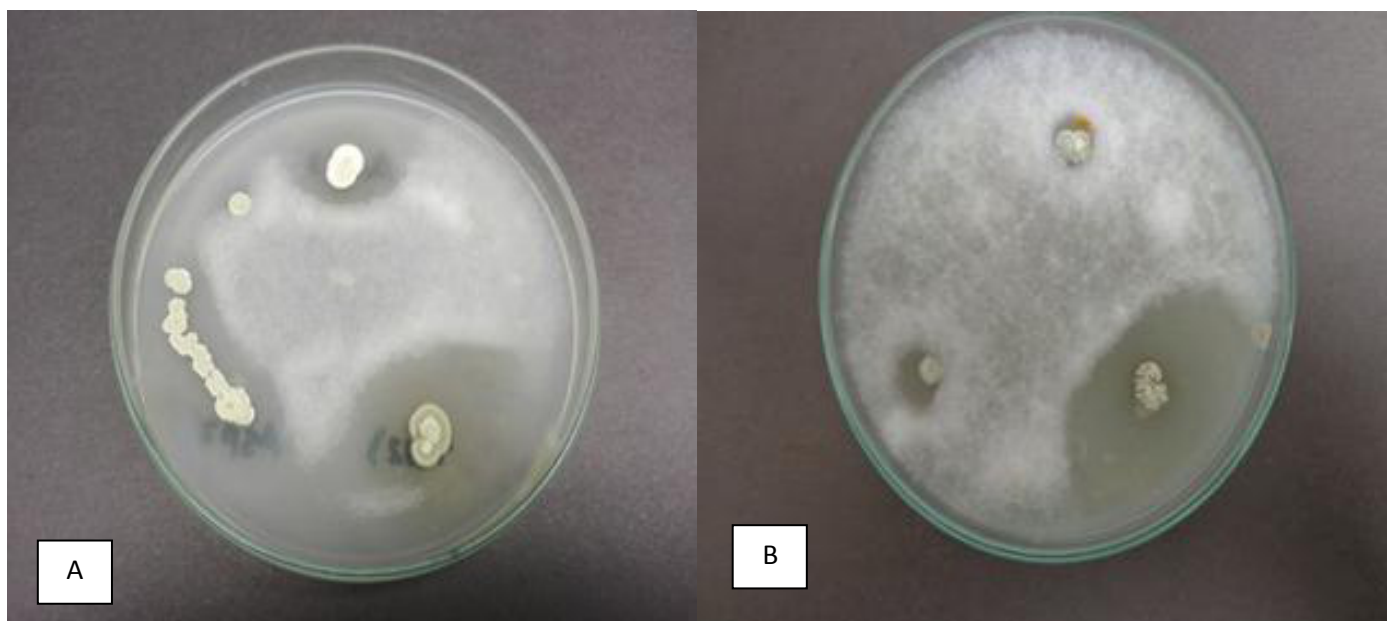
De las 32 cepas de actinomicetos nativos, el 71,9% (23) de estas cepas inhibieron el crecimiento del oomiceto *Phytophthora infestans*.

Los porcentajes de inhibición varían entre 13,33 y 80,05%, siendo la cepa CAB10\_2 aquella obtuvo el porcentaje de inhibición más alto en Agar Avena y en Agar Centeno respectivamente (Figura 12 y Figura 13)

**Tabla 6.** Antagonismo de los actinomicetos nativos frente a *Phytophthora infestans* en agar Avena y en agar Centeno

NRO DE CEPA	CEPA	VARIEDAD DE PAPA	INHIBICIÓN A <i>P. infestans</i> (%)	
			AGAR AVENA	AGAR CENTENO
1	CAB3_1	Canchán	50	0
2	CAB3_2	Canchán	13,33	0
3	CAB3_3	Canchán	0	0
4	CAB4_1	Canchán	33,33	0
5	CAB4_2	Canchán	26,66	37,50
6	CAB4_3	Canchán	16,66	16,67
7	CAB4_4	Canchán	33,33	32,79
8	CAB4_5	Canchán	57,14	38,00
9	CAB4_6	Canchán	11,11	0
10	CAB5_1	Futis	16,66	0
11	CAB5_2	Futis	44,44	21,05
12	CAB5_3	Futis	16	0
13	CAB5_4	Futis	44,44	0
14	CAB5_5	Futis	37,5	0
15	CAB6_1	Futis	0	0
16	CAB7_1	Huayro	37,3	37,3
17	CAB7_2	Huayro	0	0
18	CAB7_3	Huayro	0	0
19	CAB7_4	Huayro	0	0
20	CAB7_5	Huayro	16,66	0
21	CAB8_1	Huayro	37,73	0
22	CAB8_2	Huayro	33,33	0
23	CAB9_1	Cuchipa-akan	30,43	0
24	CAB9_2	Cuchipa-akan	58,33	0
25	CAB9_3	Cuchipa-akan	0	0
26	<b>CAB9_4</b>	<b>Cuchipa-akan</b>	<b>77,47</b>	<b>30,16</b>
27	CAB10_1	Jompis	39,81	<b>42,31</b>
28	<b>CAB10_2</b>	<b>Jompis</b>	<b>80,05</b>	<b>43,90</b>
29	CAB10_3	Jompis	0	0
30	CAB10_4	Jompis	40	0
31	CAB10_5	Jompis	60	0
32	CAB10_6	Jompis	60	31,07





**Figura 12.** Antagonismo frente a *Phytophthora infestans* en Agar Avena

A. Las cepas CAB4\_2, CAB4\_4 y CAB4\_5 son antagonistas frente a *Phytophthora infestans* en Agar Avena.

B. La cepa CAB10\_2 con 80,05% de inhibición es la más antagonista frente a *Phytophthora infestans* de los 32 actinomicetos aislados en Agar Avena.



**Figura 13.** La cepa CAB10\_2 con 43,90% de inhibición es la más antagonista frente a *Phytophthora infestans* de los 32 actinomicetos aislados en Agar Centeno.

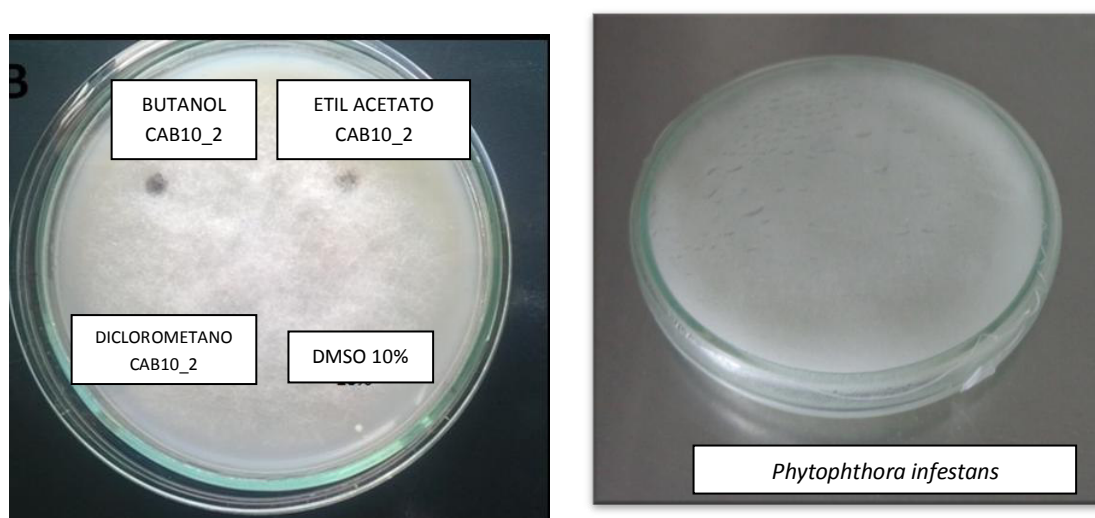
### 7.7. ACTIVIDAD ANTI-*Phytophthora* DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS

El actinomiceto CAB10\_2, cepa que fue elegida para probar la actividad de los extractos mediante los siguientes solventes: acetato de etilo, diclorometano y butanol; ninguno de estos extractos, mostraron actividad in vitro frente al cultivo de *Phytophthora infestans* (Figura 14). A pesar de que se determinó el peso seco a cada extracto (Tabla 7), estos al ser resuspendidos en DMSO al 10% no fueron activos en las pruebas.

**Tabla 7.** Extractos orgánicos con distintos solventes para la cepa CAB10\_2

SOLVENTE	ETIL ACETATO	DICLOROMETANO	BUTANOL LIQUIDO
Peso seco (mg)	10,4	8,9	10,6

Los extractos con etil acetato, diclorometano y butanol no presentaron halos de actividad inhibitoria contra *Phytophthora infestans*.



**Figura 14.** Los extractos de la cepa CAB10\_2 en diclorometano, butanol y etilacetato en Agar Avena.

Control negativo: DMSO AL 10%

Control positivo: *Phytophthora infestans*

## VII. DISCUSIÓN

Las características en cuanto a la morfología que presentan las cepas nativas, son compatibles al género *Streptomyces*, las cuales presentan pigmentación verde, roja, naranja, gris y consistencia dura y pulverulenta, microscópicamente posee cadenas de conidias que no se fragmentan que coinciden con las características propuestas por (Reddy *et al.*, 2011).

La prueba de utilización de azúcares demostró que un buen número de actinomicetos (97%) pueden utilizar glucosa, manitol y sacarosa. En el trabajo de Rico (2009) se muestra que solo el 15% puede utilizar los azúcares ya mencionados. El presente trabajo y el de Rico (2009) tienen en común el aislamiento de cepas rizosféricas, pero la diferencia en la utilización de azúcares es abismal. Esto se puede explicar a que las muestras provienen de distintos lugares, Rico (2009) colectó tierras provenientes de Huánuco, Huancavelica, Cajamarca y Junín; mientras que en el presente trabajo las muestras fueron colectadas en Ayacucho. Por tanto, distintos climas y condiciones ambientales. Cada factor físico y químico del suelo influye en el crecimiento o actividad de los microorganismos (Benintende *et al.*, 2000).

En cuanto a los resultados con respecto a la actividad amilolítica son del 100 %, lo que comprueba el porcentaje alto de síntesis de amilasas León (2007). A su vez Caro (2016) con un porcentaje menor (89,9%) Gutiérrez (2017), tiene resultados parecidos con un 62% de actinomicetos amilolíticos siendo estas cepas de origen terrestre. En cuanto a cepas marinas (León *et al.*, 2016) reporta un resultado menor del 50 % de cepas con capacidad de sintetizar almidón.

También se determinó que un 50% tenía actividad celulolítica; un valor muy parecido a lo reportado por Gutiérrez (2017) menciona que el 53% de las cepas eran celulolíticas

respectivamente, En contraste con Caro (2016) que solo obtuvo un 26,5% de cepas celulolíticas

Los resultados con respecto a la caracterización fisiológica demuestran que es factible un bioinóculo en papa. Los resultados mostraron que a 4 °C un 87,5% y a 45 °C un 90,6% no pudieron crecer luego de un periodo de 15 días. La temperatura de la tierra evaluada (CABANA, AYACUCHO) fue 7,5°C, quizás habría dificultad en el bioinóculo ya que los actinomicetos aislados en el presente trabajo son capaces de crecer en condiciones psicrófilas (12,5%)

Rico (2009), reporta que a 10°C, el 65% de sus aislados crecieron, pero a menor tamaño. A 15°C y 20°C, el 100% de las cepas crecieron y aumentaron el tamaño de las colonias. Cisneros (2016) reporta que a 5°C ninguno de sus aislados creció, y que en el rango de 20°C-37°C los actinomicetos crecieron en un 100 %.

A diferentes pH se obtuvo que a pH 5,5, las cepas crecieron en un 100% en menos de 8 días con respecto al control. Muy similares con estos resultados, Rico (2009) quien encuentra que todos los actinomicetos pudieron crecer a pH 5,5. A diferencia de Cisneros (2016) que determina que ninguna de sus cepas crecía a pH 5,5. Muchos de estos estudios poseen características fisicoquímicas del suelo distintas, ya que provienen de la rizósfera de papa, y de suelos fértiles y fríos. Rico (2009) obtiene muestras de suelo con pH muy bajos, menores a 5.

Además, los actinomicetos a un pH de 8,5, crecieron eficientemente puesto que el 100% se desarrolló en menos de 8 días. Se puede decir que los actinomicetos rizosféricos de papa de Cabana son capaces de tolerar pH ácidos y pH básicos, coincidentemente con el MINAGRI (2014), ya que los suelos con pH entre 5,2 a 7,5 son óptimos para el desarrollo de la papa

La prueba más importante del estudio fue el ensayo de antagonismo en placa frente a *Phytophthora infestans*. Un 71,9% de los actinomicetos inhibieron a *Phytophthora infestans* en agar Avena, la cepa CAB10\_2 obtuvo halos de inhibición de 80,05% cabe resaltar que no se han encontrado estudios basados en antagonismo sobre este agar y solo un 31,3 % demostró actividad en agar Centeno con el máximo halo de inhibición de 43,90%. Por su parte, Fonseca *et al.* (2011) obtuvo que el 32% de sus actinomicetos presenta inhibición frente a *P. infestans*, los actinomicetos fueron aislados de residuos de Chipaca (*Bidens pilosa*) y el antagonismo fue realizado en Agar Centeno. Los porcentajes de inhibición están dentro del rango de 33,3% - 77,8%. En cuanto a Pérez *et al.* (2015), menciona que un 42,4% de actinomicetos son capaces de inhibir *P. infestans* también en Agar Centeno. El presente estudio posee un 43,90% en el máximo halo de inhibición mientras que para Pérez *et al.* (2015) el máximo valor posee 22%. Por su parte Caro (2016), obtuvo un porcentaje del 46,9% de los actinomicetos aislados tienen actividad positiva contra *Phytophthora infestans* en Agar Centeno, con halos de inhibición hasta de 30%, siendo mayor el porcentaje en la cantidad de actinomicetos antagonista pero menor los halos de inhibición con respecto al trabajo realizado.

Medina (2014) obtuvo resultados utilizando la técnica dúplice (Verner y Martín, 2009) en el medio Agar Extracto de levadura a 20 ° C por 22 días, donde las cepas con mayores halos de inhibición fueron 77,65% y 75,33%, mientras que en nuestro trabajo los halos de inhibición en agar Avena fueron 80,05% y 77,47% con el método de cocultivo.

La explicación a esta diferencia de resultados se podría deber a que esta especie presenta anastomosis, donde algunos grupos son más patógenos que otros y que podrían generar resistencia a los antibióticos (Cherepennikova *et al.*, 2002).

En el 2009, un actinomiceto *Streptomyces setonii* 'UFV-RD1' aislado de tomate inhibió la germinación de los conidios de los hongos (*Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Corynespora cassiicola*, *Stemphylium solani*) básicamente para el biocontrol

in vitro, para que luego el inóculo sea aplicado en un campo invernadero, En este trabajo el medio de cultivo utilizado fue Agar Papa Dextrosa (Carrer Filho, 2009) en el caso del trabajo realizado fue en placas de Agar Avena y Centeno.

El método de cultivo dual que se utilizó para investigar el antagonista de *S. rubrolavendulae* S4 indicó que se utilizó como microorganismo antagonista para la supresión del crecimiento de micelios de *P. infestans* en el agar V8. Después de incubarse durante 3 días a temperatura ambiente, los radios de crecimiento de *P. infestans* en la placa de control y el crecimiento de *P. infestans* hacia *S. rubrolavendulae* S4 se midieron aproximadamente 4,5cm y 0,75cm, respectivamente. Por lo tanto, el 83,33% de la inhibición del crecimiento ha demostrado claramente que *S. rubrolavendulae* S4 mostró una buena inhibición del crecimiento de los hongos patógenos, *P. infestans* (Loliam, 2012), esto se debe a que *Streptomyces lavendulae* se caracteriza por su capacidad para producir metabolitos activos (Ikea et al., 2003). *S. lavendulae* produce muchos antibióticos de utilidad médica incluyendo estreptotricina (Waksman, 1944) y lavendamicina (Balitz, 1982)

Un estudio realizado en Corea menciona que los antibióticos de aminoglucósidos como la paromomicina producida por *Streptomyces sp* son efectivos contra *Phytophthora infestans* in vitro en un medio sólido jugo V8 por 10 días. Si bien se sabe que los aminoglucósidos interfieren con la traducción en los ribosomas procarióticos, su modo de acción contra los eucariotas no está bien definido. Algunos protozoos ciliados eucariotas (*Tetrahymena thermophila*) y parásitos intestinales (*Giardia lamblia*) son sensibles a los aminoglucósidos con un grupo hidroxilo en 6', como lo ha hecho la paromomicina (Palmer y Wilhelm 1978 ; Edlind 1989 ). Parece posible que los oomycetes reportan un grupo bastante especial en la filogenia que tiene sensibilidad procariota a la acción de los antibióticos aminoglucósidos. Además, la sensibilidad puede ser diferente dentro de las

especies o géneros de oomycetes. (Ann y Ko 1988). En el 2014 *Streptomyces plicatus* mostró una inhibición significativa del crecimiento contra patógenos fúngicos *Phytophthora infestans* (80-100% en 2000-5000 ppm) y *Sclerotium rolfsii* (86-94% al 2000-5000ppm). Los microorganismos productores de quitinasa tienen demostrado ser uno de los buenos agentes de control biológico en patógenos de la pared celular de proteínas tales como como *Phytophthora* y *Pythium* (Lima *et al.*, 1998). Ciertos metabolitos producidos por los actinomicetos podrían ser antifúngicos, inhibiendo el crecimiento de hifas, según lo informado por Gopalakrishnan *et al.* (2011) y Kavitha *et al* Alabama. (2010). En general, casi todas sustancias antimicrobianas producidas son metabolitos secundarios extracelulares (Hacene *et al.*, 2000)

En las pruebas de antagonismo frente a los *Phytophthora infestans*, la cepa CAB9\_2 obtuvo mayores halos en Agar Avena y Centeno, con capacidad psicrófila, utilización de azúcares y producción de enzimas extracelulares, hacen de esta cepa potencial candidata a pruebas en campo.

En cuanto a utilización de solventes por extractos orgánicos, se sabe que Pérez *et al.* (2015) obtiene extractos con dos solventes, los cuales son etil acetato y diclorometano. En etil acetato obtiene mejores resultados.

Leiva *et al.* (2004) utilizó 5 solventes como éter de petróleo, cloroformo, etilmetilcetona, acetato de etilo y butanol; siendo los más activos los que contienen etilmetilcetona y acetato de etilo para 13 actinomicetos. Cabe resaltar que la polaridad es una característica muy importante de los solventes debido a que determina la solubilidad (Vijayakumar *et al.*, 2010). Asimismo, Remya *et al* 2008 utilizaron extractos orgánicos de actinomicetos con solventes como metanol, cloroformo y acetato de etilo frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como también a levaduras; siendo el extracto de acetato de etilo el de mayor actividad, siendo compatible con

Dhanasekaran *et al.* (2005), quienes obtuvieron a extractos de actinomicetos de ecosistemas salinos, utilizando como solventes, anilina, cloroformo, piridina y acetato de etilo frente bacterias Gram negativas y Gram positivas, tales como *E. coli* y *S. aureus*; sin embargo, los extractos de acetato de etilo generaron mejores resultados.

El extracto orgánico a partir de acetonitrilo y hexano de hongos nativos frente a bacterias Gram positivas, negativas y levaduras en cromatografía, resultaron ser buenos solventes para esta técnica (De la Rosa, 2007). Todos estos resultados evidencian que el etil acetato recupera mejor los metabolitos activos, ya que arrastra a las sustancias más polares, y estas a su vez tienen mayor capacidad antagonista frente a microorganismos patógenos (Okeleye *et al.*, 2010). En el presente trabajo ninguno de los solventes fue capaz de arrastrar los metabolitos con posibilidad de generar halos de inhibición, esto quizás es debido a la escasa o nula afinidad entre metabolito-solvente.



## VIII. CONCLUSIONES

1. La zona rizosférica de la papa nativa (*Solanum tuberosum* L en cultivos orgánicos, presenta actinomicetos con potencial actividad frente al oomiceto *Phytophthora infestans*.
2. La cepa CAB10\_2 (80.05% de inhibición) fue el actinomiceto más antagonista frente a *Phytophthora infestans* en agar Avena, siendo potencialmente con mejores condiciones para enfrentar en campo a este fitopatógeno, debido a que crece a 4° C y utiliza diversas fuentes carbohidratos y distintos rangos de pH.
3. Los actinomicetos aislados mostraron tener alta capacidad hidrolítica sobre polisacáridos como el almidón y celulosa, evidenciando su importancia al degradar la materia orgánica en el ambiente, así como la asimilación de azúcares.
4. Los actinomicetos aislados por su buen desarrollo en ensayos de laboratorio en diferentes rangos de pH y temperatura, estarían mejor adaptados a condiciones de suelos con pH neutro, alcalino y condiciones de psicofilia (4°C) hasta los 28°C, pero no a 45°C.
5. De los resultados de antagonismo en Agar avena, un 71,9% de los actinomicetos nativos rizosféricos de la papa presentaron actividad antagonista frente a *Phytophthora infestans*.
6. Tanto para aislamiento de actinomicetos como para las pruebas de antagonismo frente *Phytophthora infestans* el medio Agar Avena fue más eficiente. Los actinomicetos desarrollaron considerablemente en menor tiempo en comparación con otros medios (Centeno, Agar Almidón Caseína, Asparragina o Czapeck).
7. Por la ausencia de actividad inhibitoria de los extractos orgánicos el etil acetato, diclorometano y butanol, no serían los adecuados para la extracción del metabolito.

## IX. RECOMENDACIONES

1. Seguir aislando actinomicetos rizosféricos de papas nativas de Cabana frente a fitopatógenos del cultivo que se presenten con mayor frecuencia en la zona.
2. Complementar el estudio de los actinomicetos bioactivos con la curva de crecimiento microbiano, además de extraer metabolitos con otros solventes para obtener halos de inhibición confiables y cuantificables.
4. Separar e identificar de los metabolitos secundarios anti-*Phytophthora*. .
5. Preparar la inoculación de actinomicetos productores de metabolitos anti-*Phytophthora* en plantas de *Solanum tuberosum* de diferentes variedades a nivel de invernadero, con el fin de evaluar es beneficioso su uso *in vivo*. Y corroborar los resultados de las pruebas *in vitro*.
6. Mediante pruebas moleculares y microscopía electrónica, hacer el reconocimiento de especies de los actinomicetos nativos aislados de la rizósfera de papa de Cabana.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGBOYE, M., Y BABALOLA, O. (2013). Actinomicetos: una fuente inagotable de metabolitos secundarios bioactivos. Patógenos microbianos y estrategias para combatirlos: ciencia, tecnología y educación, Formatex, Badajoz, 786-795.

AHMED H., N. LABUSCHAGNE & L. KORSTEN. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* and crown root of sorghum in Ethiopia. Biological control 40: 97-106.

ANN, P.J. AND KO, W.H. (1988) Hormonal heterothallism in *Phytophthora parasitica*: a novel mode of sexual reproduction? J Gen Microbiol 134, 2895–2992.

ARCE, F 2002. El cultivo de la patata. 2da ed. Madrid: S.A. Mundi-prensa, 381 p.ISBN: 9788484760788.

Arcos, F & Montalvo, N. (2017). Modelación matemática para estimar los requerimientos hídricos de papa (*Solanum spp.*) Riobamba, Ecuador.

BALITZ DM, BUSH JA, BRADNER WT, DOYLE TW, O'HERRON FA, NETTLETON DE. 1982. Aislamiento de lavendamicina, un nuevo antibiótico de *Streptomyces lavendulae*. J Antibiot (Tokio). **35** (3): 259-65

BENINTENDE S, SÁNCHEZ C. 2000 Microorganismos del suelo. 1st Ed. Universidad Nacional de Entre Ríos - Facultad de Ciencias Agropecuarias.

BÉRDY, J. (2012). Pensamientos y hechos sobre los antibióticos: dónde estamos ahora y hacia dónde nos dirigimos. *El Diario de los antibióticos*, 65 (8), 385.

CAICEDO R. 2012. Producción de compuestos bioactivos de actinomicetes aislados de la rizósfera y rizoplaneo del trébol blanco (*Trifolium repens* L.) para el control de hongos fitopatógenos, bacterias y levaduras. Trabajo de graduación, Título de Ingeniero

Bioquímico. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato.

CALVO P., L. REYMUNDO & D. ZUÑIGA. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada* 7(1,2): 141-148.

CALVO P. & D. ZUÑIGA. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. Aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada* 9(1): 31-39.

CANO. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 14(2): 15-31.

CÁRDENAS G. 2009. La papa como ventaja competitiva. *Revista Pensamiento crítico* N°12, pp. 55 -78.

CARRER FILHO 2009 Potencialidade de um actinomiceto de rizosfera de tomateiro como agente de biocontrole de doenças. *Hortic. Bras.* vol.27 no.3 Brasília.

CASTILLO C. 2004. Efectividad de Actinomicetos Aislados de la Rizósfera de Papa sobre *Rhizoctonia solani* Kühn in vitro. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(2): 203-207.

CASTRO, I. y CONTRERAS, A. 2011 Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo depapa. 1era ed. Valdivia: Imprenta Austral, 72 p. ISBN: 978-956-345-156-6.

CHAPHALKAR, S. R., & DEY, S. (1998). Thermostable alkaline metalloprotease from newly isolated alkalophilic *Streptomyces diastaticus* strain SS1. *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 35(1), 34-40.

CHOI S., M. SON, S. KIM, S. CHOI, Y. LEE, J. CHOI & G. AN. 2009. Isolation and medium development of the actinomycetes, *Streptomyces griseofuscus* CNU-A91231, inhibiting phytopathogenic fungi. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 37(4): 322–332.

CARO J. 2016 Capacidad antagonista de actinomicetos aislados de rizósfera de la papa (*Solanum tuberosum* sp. *andigena*) para el control de hongos fitopatógenos de importancia agrícola

CIP 2014 Catálogo de variedades de papa nativa, HUANCABELICA PERÚ PÁG 51

CISNEROS MOSCOL, J. E. (2016). Aislamiento y selección de actinomicetos rizosféricos con potencial aplicación como bioinoculante en el cultivo de *Solanum tuberosum* sp. *andigena* (Papa).

CODEX ALIMENTARIUS 1999 La agricultura orgánica: La demanda de productos orgánicos ha creado nuevas oportunidades de exportación para el mundo en desarrollo. Revista Enfoques

CONAM (Consejo Nacional del Ambiente). 2001. Perú: Estrategia Nacional sobre Diversidad Biológica. Lima, Perú. 138 pp.

CORNELL UNIVERSITY 2015. *Plant Pathology and Plant-Microbe Biology Section*

CRAWFORD DL, LYNCH JM, WHIPPS JM, OUSLEY MA (1993) Aislamiento y caracterización de antagonistas de actinomicetos de un patógeno fúngico de la raíz. Appl Environ Microbiol 59: 3899–3905.

CUTTER, E. 1978. Structure and development of the potato plant. In: The potato crop. Ed. Chapman and Hall, London. pp. 70-152

DHANASEKARAN, D.; RAJAKUMAR, G.; SIVAMANI, P.; SELVAMANI, R.; PANNEERSELVAM, A. y THAJUDDIN, N. 2005 Screening of Salt Pans actinomycetes for antibacterial agents. The Internet Journal of Microbiology, vol. 1, no 2, p. 6-12.

DEEPA, L.; GOWTHAMI, K. y KUMAR, K. 2011. In vivo screening of antimicrobial activity of soil actinomycetes against human pathogens. World Journal of Agricultural Sciences. vol. 7, no 5, p. 624-628.

EDLIND, T.D. 1989 Susceptibility of *Giardia lamblia* to aminoglycoside protein synthesis inhibitors: correlation with rRNA structure. Antimicrob Agents Chemother 33, 484–488.

EGÚSQUIZA B. Y APAZA W. 2001 La Mancha de la Papa (*Phytophthora infestans*) en el Perú. Perfil de País. Estado Actual del Manejo Integrado del Tizón (MIP-Tizón) en Países Andinos, p. 29-39.

FAIGUENBAUM, H. 1988. ARVEJA. P. 213-228. IN H. FAIGUENBAUM (ED.). Producción de cultivos en Chile. Cereales, leguminosas e industriales. Publicitaria Torrelodones, Santiago, Chile.

FAO.2011. La agricultura orgánica: La demanda de productos orgánicos ha creado nuevas oportunidades de exportación para el mundo en desarrollo. Revista Enfoques

FLÄRDH, K. y BUTTNER, 2009. M. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nature Reviews Microbiology. vol. 7, p. 36-49.

FONSECA Y. A., D. E. CASTELLANOS & T. E. LEÓN. 2011. Efecto antagónico in vitro de actinomicetos aislados de purines de chipaca (*Bidens pilosa* L.) frente a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 64(2): 6111-6119.

FRANCO-CORREA M. 2009. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. Revista Peruana de Biología 16(2): 239-242.

FRANCO-CORREA M., A. QUINTANA, C. DUQUE, C. SUAREZ, M. RODRIGUEZ & J. BAREA. 2010. Evaluation of actinomycetes strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology* 45: 209-217.

FRY 2008, W. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology* vol. 9, no 3, p. 385-402.

GARRY, G., FORBES, GA, SALAS, A., SANTA CRUZ, M., PEREZ, WG, Y NELSON, RJ (2005). Diversidad genética y diferenciación de hospedadores entre aislamientos de *Phytophthora infestans* de papa cultivada y hospedadores silvestres solanáceos en Perú. *Fitopatología*, 54 (6), 740-748.

GHANEM N. B., S. A. SABRY, Z. M. EL-SHERIF, *et al.* 2000. Isolation and Enumeration of marine Actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 105-111.

GOODFELLOW, M. y FIEDLER, H. 2010. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 98, p. 119–142.

GONZA K., E. LÓPEZ, C. ZAVALETA, J. DE LA CRUZ & W. MENDOZA. 2013. Efecto biofungicida de *Trichoderma harzianum* y de extractos de *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis* y *Ricinus communis* sobre *Rhizoctonia solani*. *REBIOLEST* 1(1): 43-48.

GONZALES-FRANCO A. C. & L. R. HERNÁNDEZ. 2009. Actinomycetes as biological control agents of phytopathogenic fungi. *TECNOCENCIA Chihuahua* 3(2): 64-73.

GOPALAKRISHNAN, S., PANDE, S., SHARMA, M., HUMAYUN, P., KEERTHI KIRAN, B., SANDEEP, D., VIDYA, M., DEEPTHI, K., RUPELA. O. 2011. Evaluation of actinomycetes isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of Fusarium wilt chickpea. *Crop Prot.*, 30: 1070 1078.

GUTIERREZ ESPINOZA, C. A. (2017). Aislamiento, caracterización y evaluación de la capacidad antimicrobiana de actinomicetos asociados a hormigas cortadoras de hojas (Formicidae: Myrmicinae: Attini).

HACENE, H., DAOUDI, H., BHATNAGAR, T., BARATTI, J.C., LEFEBVRE, G.A. 2000. New aminoglycosidase anti *Pseudomonas* antibiotic produced by a new strain of *Spirillospora*. *Microbios.*, 102: 69-77.

HAAS, B. J., KAMOUN, S., ZODY, M. C., JIANG, R. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*. 461: 393-398.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. 1975. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia* 67 (3): 597-607.

HASANI, A.; KARIMINIK, A. y ISSAZADEH, K. 2014. Streptomycetes: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research* vol. 2, no 1, p. 63-75.

HAYAKAWA M., Y. YOSHIDA & Y. LIMURA. 2004. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *J. Appl. Microbiol.* 96(5): 973-981.

HAWKSWORTH, D.L., Y. M.T. KALIN-ARROYO. 1995. Magnitude and distribution of biodiversity. pp. 107-191.

HENDERSON, G., P. KRYGSMAN, ET AL. (1987). "Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*." *J. Bacteriol.* 169(8): 3778-3784.

IKEA H, ISHIKAWA J, HANAMOTO A, SHINOSE M, KIKUCHI H, SHIBA T, SAKAKI Y, HATTORI M, OMURA S. 2003. Secuenciación completa del genoma y análisis



comparativo del microorganismo industrial *Streptomyces avermitilis*. Nat Biotechnol. 21: 526-531.

INFOAGRO 2018, Manejo del tizón tardío en papa: *Phytophthora infestans*

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS. (2006) Guía para el manejo y toma de datos de ensayos de mejoramiento de papa. Quito: p. 24

JARAMILLO, S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 141pp.

JIMÉNEZ, A., M. ZALACÁIN, ET AL. (1987). "Clonación y análisis de genes implicados en la biosíntesis de antibióticos." Nuevas tendencias. Ingeniería genética (Renard, J. y Vicente, M., ed.): 496-502.

JUÁREZ, G.; SOSA, M. y LÓPEZ, A. 2010, Hongos fitopatógenos de alta importancia agrícola: descripción y métodos de control. Temas selectos de alimentos. Vol. 4 no 2, p. 14-23.

KATSIFAS, E.; KORAKI, T. y KARAGOUNI, A. Determination of metabolic activity of streptomycetes in soil microcosms. Journal of Applied Microbiology. 2000, vol. 89, p. 178-184.

KAVITHA, A., VIJAYALAKSHMI, M., SUDHAKAR, P., NARASIMHA, G. 2010. Screening of actinomycete strains for the production of antifungal metabolites. Afr. J. Microbiol. Res., 4(1): 27-32 KUMAR, P. y JAIN, P. Isolation, characterization and antifungal activity of *Streptomyces sampsonii* GS1322. Indian Journal of Experimental Biology. 2007, vol.45, p. 203-206.

KUMON Y, SASAKI Y, KATO I, TAKAYA N, SHOUN H, BEPPU T (2002) Codenitrification y denitrification son vías metabólicas duales a través de las cuales el dinitrógeno evoluciona del nitrato en *Streptomyces antibioticus* . J Bacteriol 184: 2963–2968.

LECHEVALIER, M. P. (1980). The chemotaxonomy of actinomycetes. *Actinomycete taxonomy*, 227-291.

LEIVA, S.; YÁÑEZ, M.; ZAROR, L.; RODRÍGUEZ, H. y GARCÍA, H. 2004. Actividad Antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. Revista médica de Chile. vol. 132, p. 151-159.

LEÓN J., L. LIZA, I. SOTO, D. CUADRA, L. PATIÑO & R. ZERPA. 2007. Actinomycetes bioactivos de sedimento marino de la costa central del Perú. Revista Peruana de Biología 14(2): 259-270.

LEÓN, J. y LEÓN, M. 2017. Cabana historia, cultura y tradición. Centro Unión Cabana, p. 17-20.

LIMA, L.H.C., MARCO, J.L., FELIX, C.R. 1998. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por microparasitismo. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (Eds.), Controle Biológico. Jaguariuna: EMBRAPA- Meio

LLÁCER, G., LÓPEZ, M., TRAPERO, A. Y BELLO, A. (EDS.). 1996. Patología Vegetal. M.V. Phytoma – España. Tomo II. p. 721.

LOLIAM B., MORINAGA T. & CHAIYANAN S. 2012. Biocontrol of *Phytophthora infestans*, Fungal pathogen of seedling damping off disease in economic plant nursery. Hindawi Publishing Corporation Psyche Volume 2012, Article ID 324317, 6 pages.

LONG, C.M., M.J. VIROLLE, ET AL. (1987). "Alpha-amylase gene of *Streptomyces limosus*: nucleotide sequence, expression motifs, and amino acid sequence homology to mammalian and invertebrate alpha-amylases." J. Bacteriol. 169(12): 5745-5754.

MARÍN M., I. WONG, G. GARCÍA, R. MORÁN, R. BASULTO, E. PIMENTEL & J. MENA. 2013. Actividad antagónica *in vitro* de *Tsukamurella paurometabola* C-924 frente a fitopatógenos. Rev. Protección Veg. 28(2): 132-137.

MANRIQUE, K. 2001. Nociones del manejo post-cosecha. Centro Internacional de la Papa (CIP) 2: 1-15.

MANTECA, A. y SANCHEZ, 2010, J. *Streptomyces* developmental cycle and secondary metabolite production. Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb.Biotechnol. vol 1, p. 560–566.

MEDINA A. 2014 Selección de actinomicetos de suelos paperos de la provincia de Loja antagónicos a *P. infestans*.y *Rhizoctonia solani* en pruebas In Vitro e Invernadero, p 1-100

MINCETUR 2013 Papa nativa del Perú: El legado andino que alimenta al mundo PROM PERÚ

MINCETUR 2016 Productos orgánicos del Perú deslumbran en feria más importante del mundo del sector

MINISTERIO DE AGRICULTURA. 2011. La papa nuestra de cada día. Lima, Perú. 13 pp.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO. 2013. Papa. Principales aspectos agroeconómicos la Cadena Productiva de la papa Lima, Perú. 1ra edición.41 pp.

- MONSALVE-FONNEGRA Z. I., M. I. MONSALVE-RESTREPO, A. I. URREA-TRUJILLO & J. L. ZAPATA. 2012. Expresión diferencial durante la interacción *Solanum tuberosum* – *Phytophthora infestans*. Rev. Colomb. Biotecnol. 14(1): 77-92.
- MORALES GARZÓN 2007. Sociedades precolombinas asociadas a la domesticación y cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*) en Sudamérica. Rev Revista Latinoamericana de la Papa. 14(1): 1-9.
- MOROSOLI, R., BERTRAND, JL, MONDOU, F., SHARECK, F., Y KLUEPFEL, D. (1986). Purificación y propiedades de una xilanasa de *Streptomyces lividans*. *Biochemical Journal*, 239 (3), 587-592.
- MUHARRAM M. M., M. S. ABDELKADER & S. I. ALQASOUMI. 2013. Antimicrobial activity of soil actinomycetes isolated from Alkharj, KSA. International Research Journal of Microbiology 4(1): 12-20.
- OKELEYE, B.; SAMIE, A.; BESSONG, P.; MKWETSHANA, N.; GREEN, E.; CLARKE, A. y NDIP, R. 2010, Crude ethyl acetate extract of the stem bark of *Peltophorum africanum* (Sond, Fabaceae) possessing in vitro inhibitory and bactericidal activity against clinical isolates of *Helicobacter pylori*. Journal of Medicinal Plants Research. vol. 4, no 14, p. 1432-1440.
- ORTIZ O., WINTERS P & FANO H.1999 La Percepción de los Agricultores sobre el Problema del Tizón Tardío o Rancho (*Phytophthora infestans*) su Manejo: Estudio de Casos en Cajamarca, Perú, Revista Latinoamericana de la Papa. 11:97-120
- PALMER, E. AND WILHELM, J.M. (1978) Mistranslation in a eukaryotic organism. Cell 13, 329–334.
- PANDEY B., P. GHIMIRE & V. P. AGRAWAL. 2004. Studies on the antibacterial activity of actinomycetes isolated from the Khumbu region of Mt. Everest. A paper presented in the

International Conference on the Great Himalayas: Climate, Health, Ecology, Management and Conservation, Kathmandu. January 12-15, 2004. Organized by Kathmandu University and the Aquatic Ecosystem Health and Management Society, Canada.

PÉREZ F. 2011. Actinomicetos del compost antagonistas a microorganismos fitopatógenos de papa (*Solanum tuberosum* L.) subespecie *andígena*. Tesis, Título profesional de Biólogo, Microbiólogo Parasitólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

POLTI, MA, GARCÍA, RO, AMOROSO, MJ, Y ABATE, CM (2009). Biorremediación de suelos contaminados con cromo (VI) por *Streptomyces* sp. MC1. Diario de microbiología básica, 49 (3), 285-292.

QUIÑONES, E.; EVANGELISTA, Z. y RINCÓN, G. 2016. Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. Elementos. Vol. 101, p. 54-64.

RAMÍREZ F., M. FOURNIER, C. RUEPERI & C. HIDALGO. 2014. Uso de agroquímicos en el cultivo de papa en Pacayas, Cartago, Costa Rica. Agron. Mesoam. 25(2): 337-345.

REINOSO Y., D. VAILLANT, L. CASADESÚS, E. GARCÍA & V. PAZOS. 2007. Cepas de *Brevibacillus laterosporus* y *Brevibacillus brevis* antagonistas de bacterias y hongos fitopatógenos del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Fitosanidad 11(2): 79-80.

REMYA, M y VIJAYAKUMAR, R. 2008. Isolation and characterization of marine antagonistic Actinomycetes from West Coast of India. Medicine and Biology. Vol.15, no 1, p. 13-19.

RICO M. 2009. Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. Tesis, Título profesional de Biólogo,

Mención en Biología Celular y Genética. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

RODRÍGUEZ M. 2001. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) Número especial 1: 53-78.

ROSSMAN, A. Y., PALM, M. E., & MCCRAY, E. B. (2007). Fungal databases, systematic botany and mycology laboratory, ARS, USDA.

SADEGHI A., A. R. HESSAN, H. ASKARI, S. AGHIGHI & G. H. SHAHIDI. 2006. Biological control potential of two *Streptomyces isolates* on *Rhizoctonia solani*, the causal agent of damping-off of sugar beet. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9(5): 904-910.

SALAZAR, A.; ORDOÑEZ, C.; HERNÁNDEZ, D.; CASTAÑO, L.; PEÑA, K.; RODRÍGUEZ, J. y BUENO, L. 2014, Actinomicetos aislados del suelo del Jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. *Scentia et Technicavol*. Vol 19, no 1, p. 223-229.

SÁNCHEZ M., S. SÁNCHEZ, G. GALLEGOS, & A. SANCHEZ. 2011. Actividad inhibitoria de Actinomicetos aislados de hormigas cultivadoras de hongos (Hymenoptera: Formicidae) sobre *Colletotrichum lindemuthianum* y *Rhizoctonia solani*. *Revista Agraria – Nueva Época* 8(1): 14-17.

SHARMA H. & L. PARIHAR.2010. Antifungal activity of extracts obtained from actinomycetes. *Journal of Yeast and Fungal Research* 1(10): 197–200.

SINGH, S.; KUMAR, P.; GOLAPAN, N.; SHRIVASTAVA, B.; KUHAD, R. y SINGH, H. 2012. Isolation and partial characterization of actinomycetes with antimicrobial activity against multidrug resistant bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, p. S1147-S1150.

SENASA Decreto Supremo N° 044-2006 Autoridad Nacional Competente, Producción orgánica 2015.

SMART, C. D., SANDROCK, R. W., AND FRY, W. 2000. Molecular Techniques and Mystery of the Potato Late Blight Pathogen. Plant-Microbe Interactions. Edited by Gary Tacey and Noel Keen. 336 p. APS (American Phytopathology Society).

SPANDARI, C.; ANTUNES, T.; TEIXEIRA, R.; MONOTTO, E.; FUENTEFRÍA, A. Y VAN DER SAND, S. 2013 Antifungal activity of actinobacteria against fungus isolates of clinical importance. Revista Brasileira de Biociencias, vol. 11, no 4, p. 439-443.

TAPIA, M. y FRIES M. Guía de campo de los cultivos andinos. 1era ed. Lima: FAO y ANPE, 2007. 222 p. ISBN: 978-92-5-305682-8. Biochemistry and Microbiology. 2006, vol. 42, no 2, p. 117-126.

TATE, R. 2000. Soil Microbiology. Second Ed. Wiley, New York, USA. pp. 47-56

TORRES, H. 2002. Manual de las enfermedades más importantes de la Papa en el Perú. 1era ed. Lima: Centro Internacional de la Papa, 68 p. ISBN: 92-9060-212-0.

UNALM. Guía técnica Curso-taller Manejo Integrado de papa. 1era ed. Lima: Agrobanco, 2011. 47 p. Uzcátegui M., J. A. Serrano & M. Panizo. 2013. Condiciones de cultivo que fomentan la producción de sustancias antimicrobianas en actinomicetos patógenos y del suelo. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 33: 134-139.

VAN KEULEN, H., KROPFF, M.J., BASTIAANS, L., Y GOUDRIAAN, J. (2003). Sobre los enfoques y aplicaciones de los modelos de cultivo de Wageningen. Revista europea de agronomía, 18 (3-4), 201-234.

VIMAL, B.; RAJAN, B. y KANNABIRAN, K. 2009. Antimicrobial Activity of Marine Actinomycete, Nocardiosis sp. VITSVK 5 (FJ973467). Asian Journal of Medical Sciences, vol. 1, no 2, p. 57-63.

WAKSMAN SA, BUGIE E, A SCHATZ. 1944. Aislamiento de sustancias antibióticas de microorganismos del suelo, con especial referencia a la estreptotricina y la estreptomicina . Actas de reuniones de personal de la Clínica Mayo. 19 (23): 537-548

WHITMAN W., M. GOODFELLOW, P. KAMPFER, H. BUSSE, M. TRUJILLO, W. LUDWIG & K. SUZUKI. 2012. Bergey's manual of determinative bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria. Springer Science & Business Media.1750 pp.

WILLIAMS, ST, Y FLORES, TH (1978). La influencia del pH en la hidrólisis del almidón por estreptomicetos neutrofílicos y acidófilos. Microbios, 20 (80), 99-106.

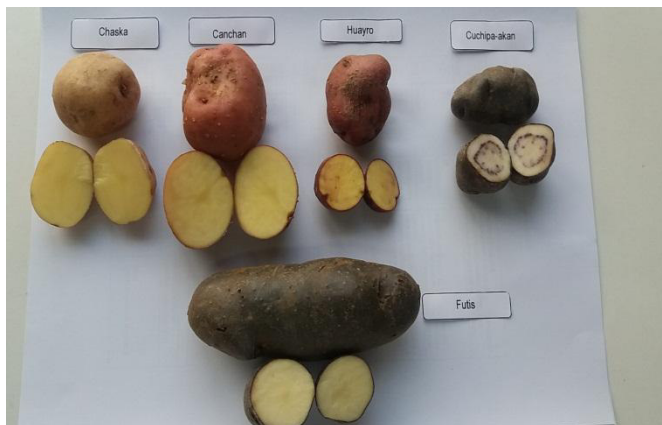


## **XII.ANEXOS**

## ANEXO 1. TOMA DE MUESTRA

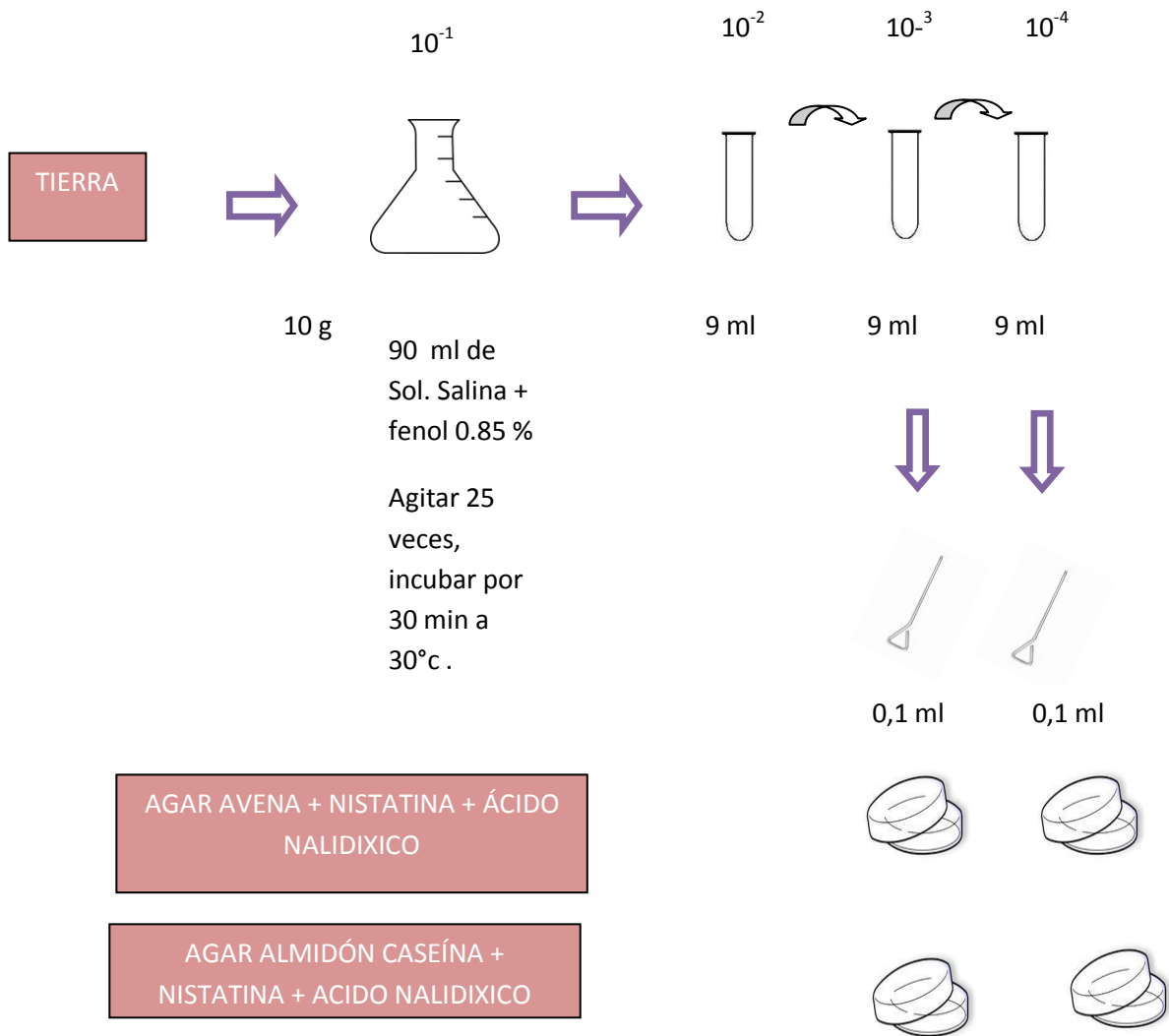
DISTRITO CABANA SUR,  
LUCANAS, AYACUCHO-PERÚ

TEMPERATURA DEL SUELO:  
7.5°C



VARIEDAD DE PAPAS NATIVAS:  
*Canchan, Huayro, Cuchipa-akan, Fufis, Jompis y Chaska* siendo 9, 7, 4, 6, 6 y 0 las colonias aisladas del suelo de estas variedades de papa respectivamente.

## ANEXO 2. AISLAMIENTO DE ACTINOMICETO



### ANEXO 3: SELECCIÓN DE ACTINOMICETOS



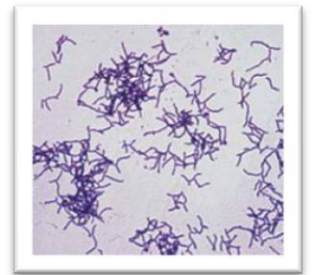
Repiques en Agar Avena: Mejor esporulación y crecimiento.

#### COMPORTAMIENTO CULTURAL:

Colonia de actinos: rugosa, costrosa, adherida fuertemente al agar.

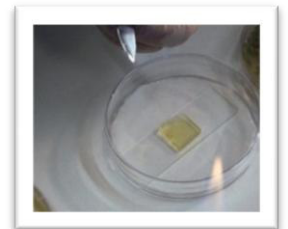
#### PRUEBAS DE SELECCIÓN PRIMARIA

GRAM: GRAM +



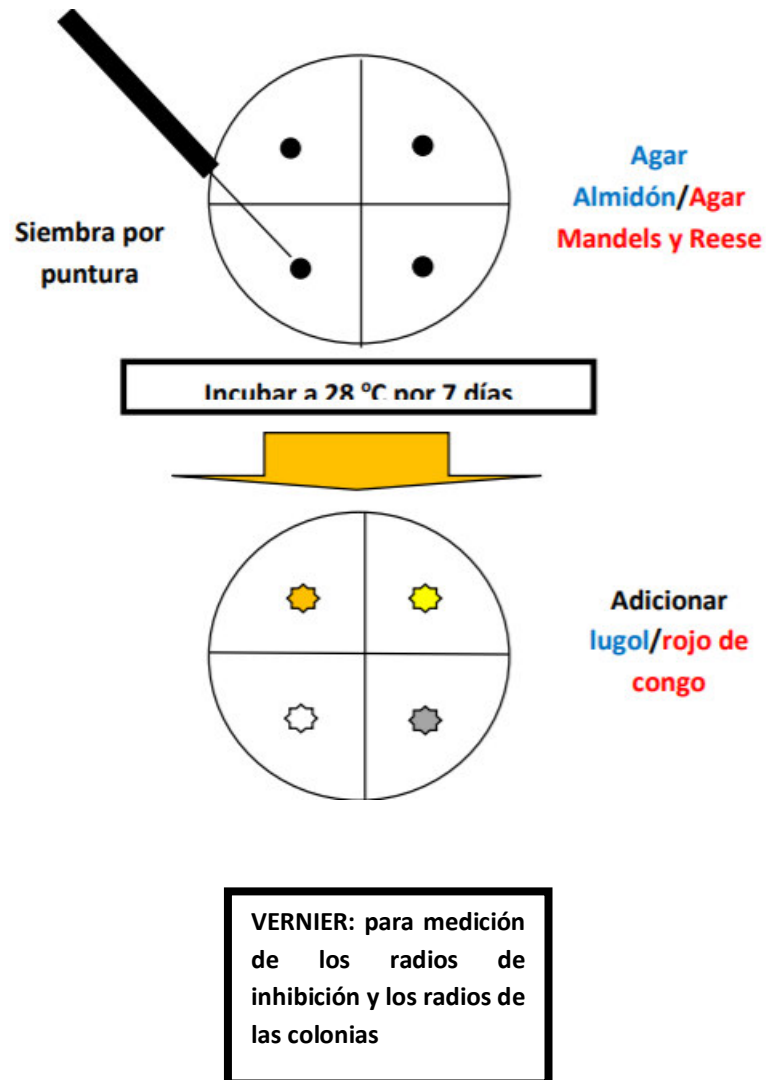
MICROCULTIVO: 7 días, hifas delgadas y esporulación

COLORANTE USADO: Azul de lactofenol



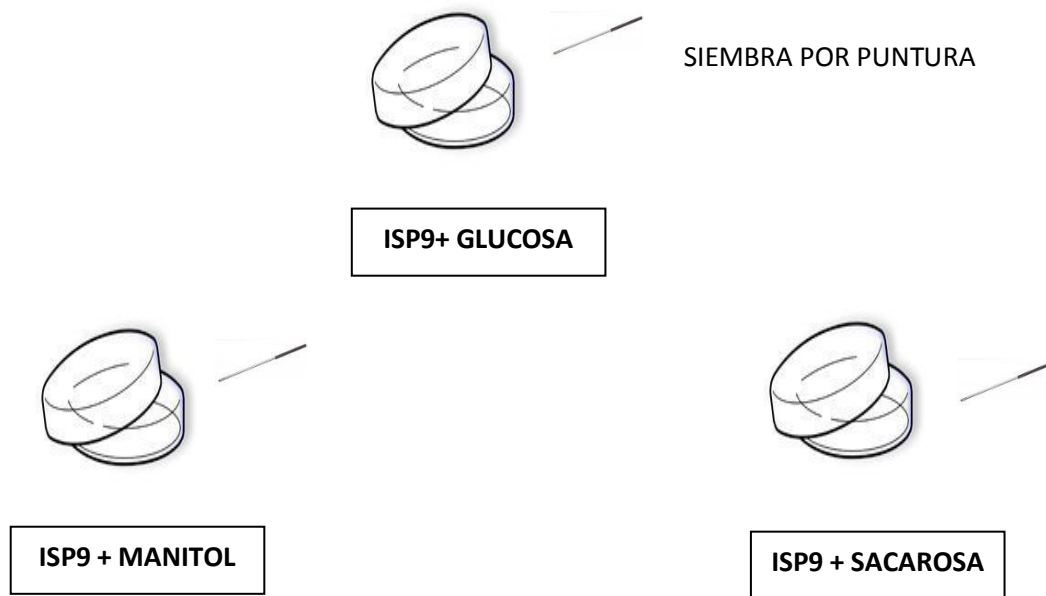
## ANEXO 4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EN AGAR

### ALMIDÓN Y AGAR CARBOXIMETILCELULOSA



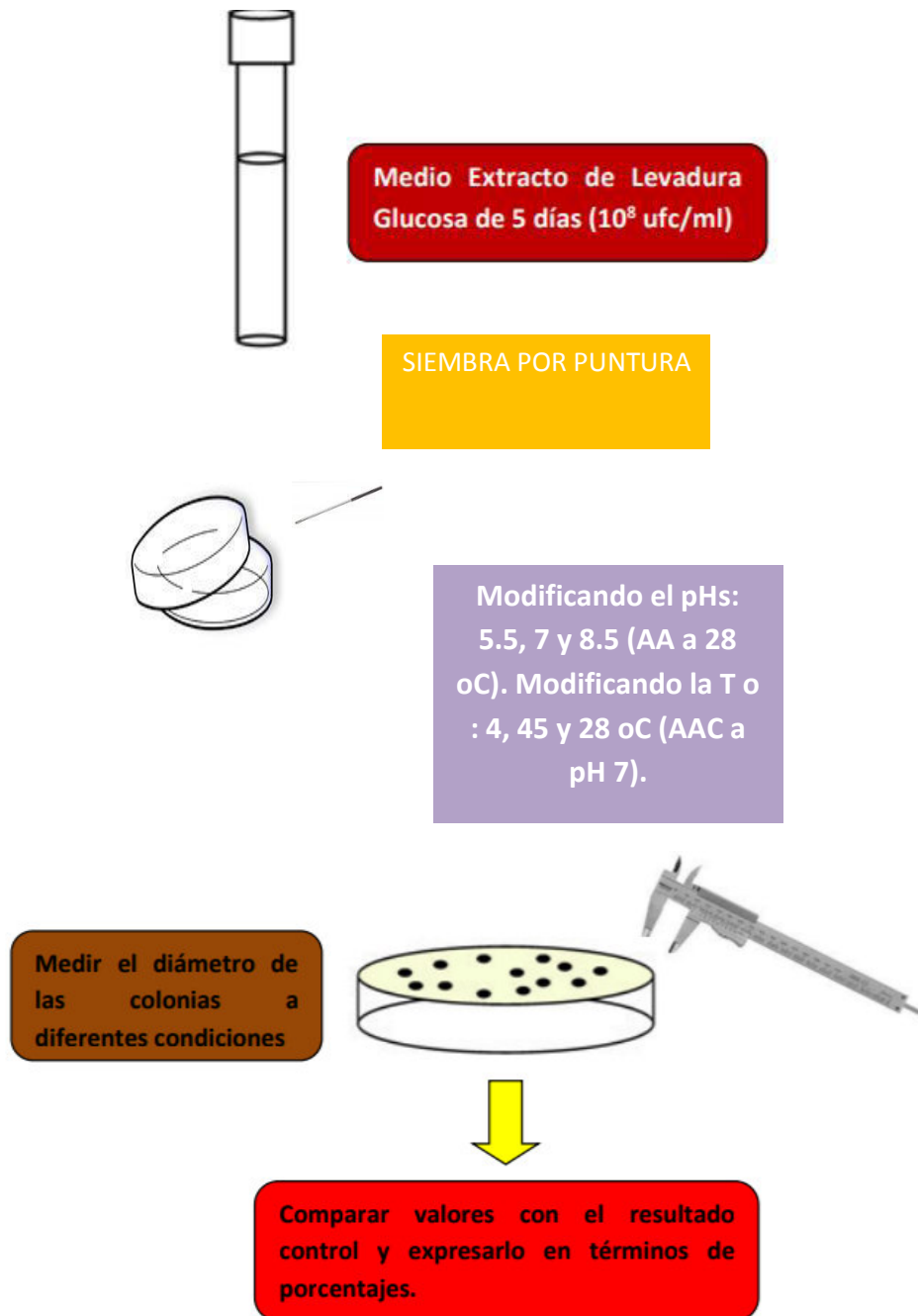
## ANEXO 5. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS ACTINOMICETOS EN EL USO DE GLUCOSA, SACAROSA Y MANITOL

Se usó medio mínimo: ISP 9



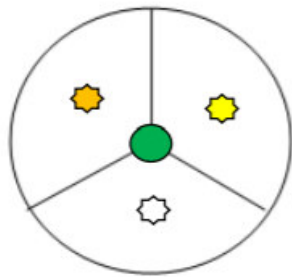
Utiliza alguno de estos carbohidratos si crece en el medio ISP 9 suplementado con alguno de estos.

## ANEXO 6. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS ACTINOMICETOS



## ANEXO 7. PRUEBAS DE ANTAGONISMO DE ACTINOMICETOS FRENTE A

### *Phytophthora infestans*



#### TECNICA DEL COCULTIVO:

SE SEMBRÓ AL MISMO TIEMPO  
LOS ACTINOMICETOS CON EL  
PATÓGENO, Y SE INCUBÓ A 28° C  
POR 10 DÍAS



#### PORCENTAJE DE INHIBICIÓN

$$\% \text{ de Actividad} = \frac{R-r}{R} \times 100$$



## ANEXO 8. EXTRACTO ORGÁNICO ANTIMICROBIANO CON ACTIVIDAD ANTI- *PHYTOPHTHORA*



25 ml de caldo inductor  
en un matraz de 100 ml

25 ml de caldo inductor  
con cepa en 225 ml de  
caldo sin sembrar  
(matraz de 500 ml)

3 días en agitación a  
250 rpm

7 días en agitación a  
250 rpm



Centrifugación a 4000 rpm  
por 25 minutos : Para  
obtener el sobrenadante.



Filtración con papel  
whatman.

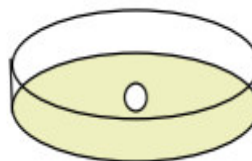


Separar solvente de  
la fase acuosa



Evaporar en rotavapor,  
obteniendo el peso del  
extracto

Habiéndose cumplido los 10 días del  
cultivo se elige solventes  
diclorometano, etil acetato y  
butanol, añadiendo en una  
proporción 1:1 (Caldo-solvente). Se  
deja en el shaker a 2



Realizar pocillos y  
añadir extractos,  
incubar.

## ANEXO 9. MEDIOS DE CULTIVO

### 1. Agar Almidón Caseína (AAC) – mg/L (Kuster y Williams, 1964)

Almidón 10,0

Caseína 0,30

Nitrato de Potasio 2,00

NaCl 2,00

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,00

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05

CaCO<sub>3</sub> 0,02

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,01

Agar 15,0

Agua destilada 1000,0 ml

pH 7,0

\*Para el aislamiento de actinomicetos.

### 2. Agar Avena - mg/L (Kuster, 1959)

Avena 20,0

Agar 18,0

Agua destilada 1000,0 ml

pH 7,2 pH 7,0

\*Para el aislamiento, cultivo de actinomicetos y *P.infestans*

### **3. Agar Centeno – mg/L (Caten y Jinks, 1968)**

Harina de centeno 25,0

Sacarosa 20,0

Agar 15,0

Agua destilada 1000,0 ml

pH 5,5

\*Para el aislamiento, cultivo de *Phytophthora infestans*.

### **4. Agar Almidón – mg/L (Modificado por Achi y Nijoku, 1992)**

Extracto de carne 3,0

NaCl 6,0

Almidón 2,0

Agar 18,0

Agua 1000,0 ml pH 7,0

\*Para la detección de la producción de amilasas.

### **5. Agar Carboximetilcelulosa – mg/L (Mandels y Reese, 1965)**

Carboximetilcelulosa 10,0

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,0

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0

Agar 18,0

Agua 1000,0 ml

pH 7,0

\*Para la detección de la producción de celulasas.

#### **6. Medio Extracto de Levadura Glucosa – mg/L (Modificado por Sultan *et al.*, 2002)**

Extracto de levadura 1,0

Peptona de soya 4,0

D-glucosa 5,0

CaCO<sub>3</sub> 1,0\*\*

Almidón 10,0\*\*

Agua 1000,0 ml

pH 7,0 \*Para la fermentación de actinomicetos. \*\*: Opcionales

#### **7. Medio ISP9: Medio de utilización de carbohidratos - mg/L (Modificado por Pridham y Gottlieb, 1948)**

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,64

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,38

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,65

MgSO<sub>4</sub> 1,0

Agar 18,0

Solución de carbohidrato 100 ml\*

Sales traza de Pridham 1,0 ml

Agua destilada 900,0 ml pH 6,8-7,0

\*Agregar 10 g de carbohidrato en 100 ml de agua destilada.

#### **8. Agar Glicerol-Asparragina - mg/L (Pridham y Lyons, 1961)**

L-Asparragina 1,0

Glicerol 10,0

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0

Agar 20,0

Solución de sales traza 1,0 ml

Agua destilada 1000,0 ml

pH 7,4

### **9. Agar Czapeck- mg/L**

Nitrato sódico 2,00 g

Cloruro potásico 0,50 g

Sulfato magnésico 0,50 g

Sulfato ferroso 0,01 g

Fosfato dipotásico 1,00 g

Sacarosa 30,00 g

Agar agar 18,00 g

(Fórmula por litro) pH final:  $6,8 \pm 0,2$